



PANDUAN PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI BERBASIS ARGUMENTASI

OLEH:

EVI ROVIATI, S.Si, M.Pd.

LAITA NURJANNAH, S.Si, M.Si.

DEDE CAHYATI SAHRIR, M.Pd.

MUHIMATUL UMAMI, M.Si.

JURUSAN TADRIS BIOLOGI

FAKULTAS ILMU TARBIYAH DAN KEGURUAN

INSTITUT AGAMA ISLAM NEGERI (IAIN) SYEKH NURJATI CIREBON

2020

**PANDUAN PRAKTIKUM
MIKROBIOLOGI
BERBASIS ARGUMENTASI**

Disusun Oleh :
EVI ROVIATI, S.Si, M.Pd
LAITA NURJANNAH, S.Si, M.Si
DEDE CAHYATI SYAHRIR, M.Pd.
MUHIMATUL UMAMI, M.Si.

LABORATORIUM BIOLOGI
UNIT LABORATORIUM MIPA
INSTITUT AGAMA ISLAM NEGERI (IAIN) SYEKH NURJATI CIREBON
2020

KATA PENGANTAR

Bismillaahirrahmaanirrahiim

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, Kami mempersembahkan Buku Panduan Praktikum Mikrobiologi Berbasis Argumentasi. Panduan ini disusun untuk kegunaan praktikum mata kuliah Mikrobiologi yang diberikan untuk mahasiswa S-1 pada Program Studi Pendidikan Biologi. Panduan praktikum ini diharapkan berfungsi sebagai pedoman bagi mahasiswa untuk praktikum di laboratorium.

Praktikum Mikrobiologi bertujuan untuk mendapatkan pengertian yang lebih mendalam mengenai materi kuliah yang diberikan dan meningkatkan keterampilan mahasiswa dalam menggunakan alat-alat laboratorium. Di samping itu, praktikum ini juga diharapkan dapat memberikan pengalaman dasar mengenai ilmu penelitian. Materi praktikum yang disajikan dalam buku ini mencakup teknik dasar pengamatan mikroorganisme dan aplikasi mikroorganisme dalam kehidupan sehari-hari serta pelatihan keterampilan argumentasi ilmiah dalam kegiatan laboratorium.

Dengan diterbitkannya buku panduan praktikum ini diharapkan dapat meningkatkan keterampilan dasar bagi mahasiswa dalam menangani alat dan bahan dalam menyelidiki mikroorganisme, serta mengembangkan keterampilan argumentasi ilmiah. Dasar teori yang tercantum dalam tiap acara praktikum hanya berisi pengetahuan dasar yang sangat minimum sehingga memberikan kesempatan mahasiswa untuk membaca pokok-pokok pengetahuan teoritis dari referensi lain.

Penyusun sadar bahwa dalam penyusunan buku panduan praktikum ini masih jauh dari sempurna, untuk itu akan selalu dilakukan perbaikan guna memenuhi tuntutan kurikulum yang berlaku. Di samping itu, penyusun mengharapkan masukan baik berupa kritik maupun saran dari pembaca dan pengguna buku ini demi perbaikan menuju kesempurnaan. Dalam penyusunan buku ini, Penyusun tidak lepas dari bantuan banyak pihak. Oleh sebab itu, Penyusun mengucapkan terima kasih atas bantuan dari pihak-pihak yang tidak dapat Penyusun sebutkan satu persatu.

Harapan Penyusun, semoga buku ini dapat bermanfaat bagi para mahasiswa serta bagi mereka yang memerlukannya. Segala kritik dan saran atas buku ini akan sangat dihargai.

Cirebon, Januari 2020

Penyusun

DAFTAR ISI

	Hal.
HALAMAN JUDUL	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
PENDAHULUAN	v
TATA TERTIB PRAKTIKUM	vi
PRAKTIKUM 1	1
Lab Safety dan Pengenalan Alat	
ACARA PRAKTIKUM 2	17
Pembuatan Media Pertumbuhan Mikroba	
ACARA PRAKTIKUM 3	27
Sterilisasi, Teknik Aseptis, Teknik Isolasi dan Pemurnian	
ACARA PRAKTIKUM 4	39
Mikroskopi, Morfologi Mikroba, dan Pewarnaan	
ACARA PRAKTIKUM 5	47
ABILA 1. Daya Kerja Anti Mikroba dan Oligodinamik	
ACARA PRAKTIKUM 6	55
ABILA 2. Mikroba dari Berbagai Lingkungan di Sekitar Kita	
ACARA PRAKTIKUM 7	63
ABILA 3. Mikroba Pangan: Kondisi Lingkungan yang Optimal dalam Fermentasi	
ACARA PRAKTIKUM 8	71
ABILA 4. Uji Mikrobiologis Kualitas Air (Metode MPN Coliform)	

PENDAHULUAN

Panduan praktikum ini disusun sebagai pedoman bagi mahasiswa untuk melakukan kegiatan Praktikum Mikrobiologi pada Program Studi S-1 Tadris IPA Biologi IAIN Syekh Nurjati Cirebon. Sasaran yang hendak dicapai meliputi:

1. Sasaran Utama

- a. Memberikan pengalaman dalam melakukan eksperimen dan pengamatan
- b. Memberikan beberapa ilustrasi praktis berkaitan dengan perkuliahan.
- c. Memberikan pengetahuan yang mendalam tentang Mikrobiologi khususnya mengenai kerangka dasar teori dan cara pemecahan masalah.
- d. Menanamkan kesadaran akan keterkaitan berbagai pengetahuan alam lainnya beserta batasan-batasannya.

2. Sasaran Khusus

- a. Mengembangkan keterampilan dalam melakukan investigasi dan eksperimen dalam bidang mikrobiologi.
- b. Melatih melakukan pengamatan dan bekerja dengan cermat.
- c. Melatih keterampilan menggunakan alat-alat gelas, zat kimia dan instrumen.
- d. Melatih menganalisis data eksperimen dan menulis laporan dengan cermat.
- e. Memberikan motivasi dalam melakukan eksperimen.
- f. Melatih berpikir dan berargumen secara ilmiah dengan berbasis data.

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Dalam melaksanakan praktikum, praktikan diharuskan memperhatikan dan mengikuti ketentuan serta aturan berikut :

A. ATURAN UMUM

1. Praktikan diwajibkan mengenakan ***Jas laboratorium*** berwarna putih disertai label nama masing-masing. Bagi mahasiswi, sebaiknya ujung jilbab dimasukkan ke dalam jas lab.
2. Praktikan harus datang tepat pada waktunya, sehingga pada saat praktikum dimulai semua sudah hadir di dalam ruangan praktikum. Mahasiswa yang terlambat 15 menit atau lebih, tidak diijinkan mengikuti pretest dan praktikum
3. Tidak diperkenankan makan, minum, merokok dan menghidupkan alat komunikasi di dalam lab selama melakukan praktikum.
4. Dilarang membuang zat padat, asam-basa pekat, sampah dan sisa larutan pereaksi ke dalam bak cuci. Buanglah sampah-sampah itu pada tempat yang telah disediakan.
5. Praktikan harus memperhatikan dengan sungguh-sungguh semua keterangan yang diberikan oleh dosen pembimbing/instruktur/asisten praktikum mengenai latihan yang dihadapi sehingga tidak akan menemukan kesulitan dalam menjalankan praktikum
6. Jangan melakukan kegiatan atau percobaan di luar petunjuk praktikum yang telah tercantum dalam panduan, tanpa izin dari Asisten Lab.
7. Setiap praktikan diwajibkan memiliki ***buku panduan praktikum***.
8. Selama melakukan praktikum, praktikan akan dibagi menjadi kelompok-kelompok (5-6 orang per kelompok) yang akan ditentukan kemudian.
9. Setiap kelompok diharuskan membawa lap tangan, lap meja, korek api, pipet, sikat tabung dan sabun pada setiap kali praktikum.
10. Setiap kelompok akan diberi peminjaman alat-alat yang sudah disediakan dalam lemari alat. Sebelum digunakan, periksa dan pastikan alat-alat dalam keadaan baik dan utuh.
11. Setiap praktikan diwajibkan mengisi daftar hadir sebelum dan sesudah praktikum. Kehadiran praktikum 100% dari keseluruhan pertemuan. Bagi yang kehadirannya kurang, maka dapat mengikuti susulan praktikum 1 minggu setelah semua acara praktikum selesai dengan menyelesaikan administrasi terlebih dahulu pada Laboran laboratorium Biologi.
12. Mahasiswa yang tidak dapat hadir untuk menjalankan praktikum diharuskan untuk menyerahkan surat keterangan dari dokter atau orang tua/wali yang menerangkan tentang ketidakhadirannya. Mahasiswa yang sampai 2 kali berturut-turut tidak hadir tanpa keterangan dianggap mengundurkan diri dan namanya akan dicoret dari daftar.

13. Sebelum dan sesudah praktikum, alat yang digunakan harus dalam keadaan bersih, utuh dan disimpan kembali di lemari. Apabila ada alat yang rusak segera lapor kepada petugas dan harus diganti dengan alat yang sama oleh kelompoknya paling lambat pada praktikum selanjutnya.
14. Sebelum meninggalkan laboratorium meja kerja harus bersih, kursi disimpan di tempatnya, dan ruangan harus bersih dari sampah.

ATURAN KHUSUS

1. Setiap praktikan harus mempelajari petunjuk percobaan yang akan dilakukan.
2. Sebelum pelaksanaan praktikum, praktikan harus menyerahkan diagram kerja dan melengkapi jurnal praktikum sesuai dengan percobaan yang akan dilakukan.
3. Sebelum percobaan dilakukan, praktikan mempunyai kesempatan untuk berdiskusi dengan asisten yang berhubungan dengan percobaan yang akan dilakukan.
4. Jika pada saat praktikum kelompok kerja praktikan tidak membawa bahan atau preparat yang akan dipraktikkan maka tidak dapat mengikuti praktikum mata acara tersebut.
5. Selama melakukan percobaan, tuliskan semua hasil pengamatan pada lembar pengamatan yang telah disiapkan dalam jurnal.
6. Setelah percobaan, jurnal harus diberikan kepada asisten laboratorium untuk diperiksa.
7. Percobaan harus selesai sampai batas waktu 15 menit terakhir dari jadwal waktu yang telah ditentukan. Alokasi waktu tersebut digunakan untuk membersihkan alat, meja kerja dan ruang laboratorium.
8. Setiap praktikan diwajibkan membuat laporan dari semua percobaan yang dilakukan. Bentuk dan pola laporan adalah sebagai berikut :
 - **Judul Percobaan**
 - **Tujuan Percobaan**
 - **Pendahuluan**, (yang berisi Latar Belakang dan Dasar Teori berkaitan erat dengan percobaan, seperti mengapa dilakukan percobaan itu dan mengapa dilakukan dengan metode yang akan dilakukan disertai pustaka yang relevan)
 - **Metode** (berisi alat, bahan dan prosedur kerja, termasuk cara pengamatannya yang dapat disajikan dalam bentuk diagram atau gambar)
 - **Hasil Pengamatan** (berisi data hasil percobaan)
 - **Pembahasan** (berisi analisis hasil pengamatan percobaan, disertai argumen ilmiah dan teori yang mendukung atau menolaknya)
 - **Simpulan**
 - **Daftar Pustaka**
 - **Lampiran**

Praktikum 1	LAB SAFETY DAN PENGENALAN ALAT
----------------	---



I. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum, mahasiswa dapat :

1. Mengetahui prosedur keselamatan kerja saat praktikum di laboratorium
2. Mengetahui dan mampu menggunakan alat-alat laboratorium mikrobiologi.
3. Mengetahui jenis-jenis dan bagian-bagian mikroskop serta mengetahui kegunaannya.
4. Menggambar bentuk-bentuk mikroba dari sela-sela gigi dan roti basi yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya

II. Pendahuluan

Biosafety adalah aplikasi prinsip keamanan di laboratorium yang memanipulasi organisme biologi. Pengertian lain menyatakan bahwa *biosafety* adalah pengurangan resiko dari paparan yang tak disengaja yang berasal dari patogen dan racun atau kecelakaan. *Biosafety* juga sebagai perlindungan terhadap manusia dari agen yang berbahaya.

Klasifikasi mikroorganisme berdasarkan resikonya terdapat empat kelompok diantaranya patogenitas mikroorganisme, mode transmisi dan jangkauan inang, ketersediaan lokal dari tindakan pencegahan yang efektif, dan ketersediaan lokal dalam pengobatan yang efektif. Fasilitas laboratorium dapat ditetapkan menjadi empat level yaitu biosafety level 1, biosafety level 2, biosafety level 3, dan biosafety level 4. Biosafety yang paling tinggi yaitu pada biosafety level 4.

Fasilitas biosafety level 1 diantaranya adalah laboratorium memiliki pintu yang terkontrol, jendela, wastafel, alat-alatnya mudah dibersihkan, dan lainnya. Fasilitas biosafety level 2 diantaranya adalah akses *limited*, terdapat tata tertib khusus dan simbol peringatan, ada vaksinasi untuk personel, pelatihan untuk personel, dan lainnya. Fasilitas biosafety level 3 diantaranya terdapat ruang ganti, pakaian khusus, sistem respirasi, sarung tangan, pelindung wajah, dan lainnya. Fasilitas biosafety level 4 yaitu terdapat pelatihan khusus untuk pekerjaanya, ada ruang khusus untuk pembersihan, dan sebagainya.

Cara kerja:

1. Menggunakan jas lab yang sesuai
2. Menggunakan sarung tangan ketika menggunakan bahan-bahan berbahaya
3. Menggunakan masker ketika menggunakan bahan-bahan berbahaya
4. Perhatikan simbol-simbol berbahaya pada bahan
5. Buang limbah praktikum pada tempat khusus yang disediakan

Berikut ini alat-alat lab mikrobiologi yang perlu dikenal:

1. Mikroskop

Mikroskop merupakan alat utama yang sering digunakan di laboratorium mikrobiologi. Dengan pertolongan mikroskop kita dapat mengamati bakteri yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Mikroskop berfungsi untuk membuat benda yang sangat kecil terlihat lebih besar dan dapat diamati. Mata telanjang tidak dapat membedakan benda dengan diameter $<0,1$ mm.



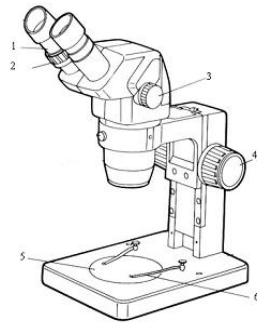
a. Jenis-jenis Mikroskop

1) Mikroskop Medan Terang

Pada mikroskop medan terang terdapat dua unsur yang berperan dalam menghasilkan gambar yang jelas, yaitu lensa dan sumber cahaya. Leeuwenhoek menggunakan lilin sebagai sumber cahaya. Masa kini digunakan lampu sebagai sumber cahaya karena mudah diatur sehingga membantu dalam menghasilkan gambar yang jelas.

Pembesaran yang dapat dicapai mikroskop medan terang adalah sekitar 1000 kali. Bila pembesaran melebihi kemampuan mikroskop maka gambar akan terlihat kabur.

Berdasarkan lensa yang digunakan, mikroskop medan terang dipilah menjadi mikroskop sederhana atau ganda. Mikroskop sederhana menggunakan satu lensa pembesaran diantara mata dan benda yang diamati. Sebaliknya mikroskop ganda menggunakan dua lensa atau lebih diantara mata dan benda yang diamati. Mikroskop ganda mempunyai dua buah okuler disebut mikroskop binokuler, sedangkan mikroskop monokuler hanya mempunyai satu okuler.



2) Mikroskop Medan Gelap

Pada mikroskop medan terang spesimen terlihat gelap dengan latar belakang terang. Sebaliknya pada mikroskop medan gelap, terlihat latar belakang yang gelap dengan spesimen yang terang. Ini terjadi karena pada mikroskop medan gelap digunakan kondensor khusus yang memiliki sudut aperture lebih besar dari lensa obyektif. Cahaya yang masuk ke dalam lensa obyektif hanyalah cahaya yang didifraksikan oleh spesimen sehingga spesimen akan terlihat terang dengan latar belakang gelap.

3) Mikroskop Kontras Fase.

Dasar mikroskop kontras fase adalah cahaya yang masuk melalui suatu spesimen sebanding dengan indeks refraksinya. Pada mikroskop ini diadakan modifikasi lensa, sehingga perbedaan derajat terang tembus dari struktur sel dengan lingkungan sekitarnya terlihat lebih jelas. Modifikasi lensa terletak pada kondensor dan lensa obyektif.

4) Mikroskop Ultra Violet

Kekuatan daya pisah mikroskop dapat ditingkatkan dengan menggunakan cahaya bergelombang pendek yaitu ultra violet (200-400 nm). Beberapa bahan kimia tertentu dapat mengabsorpsi sinar UV dan dipantulkan kembali sebagai cahaya yang bergelombang lebih panjang. Contohnya adalah fluoresein dan akridin.

5) Mikroskop Elektron



Pada mikroskop ini digunakan gelombang elektromagnetik yang mempunyai panjang 0,04 nm. Spesimen harus kering dan sangat tipis (<100 nm) karena elektron bekerja pada keadaan hampa udara dan kemampuan penetrasinya sangat rendah dan menghasilkan perbesaran yang sangat kuat. Terdapat beberapa macam mikroskop elektron, diantaranya

mikroskop elektron payar (*Scanning Electron Microscope*) dan mikroskop elektron transmisi (*Transmission Electron Microscope*).

Salah satu alat yang dapat digunakan untuk melihat sel mikroorganisme di laboratorium yang kita miliki adalah mikroskop cahaya. Dengan mikroskop ini kita dapat mengamati sel bakteri yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Pada umumnya mata tidak mampu membedakan benda dengan diameter lebih kecil dari 0,1 mm. berikut merupakan uraian tentang cara penggunaan bagian-bagiandan spesifikasi mikroskop cahaya merk Olympus CH20.

6) Mikroskop stereo (*Zoom Stereo Microscope*)

Mikroskop ini berfungsi untuk melihat objek yang membutuhkan perbesaran tidak terlalu besar. Di Laboratorium Mikrobiologi, mikroskop stereo biasanya digunakan untuk mengamati secara detail bentuk koloni dan jamur. Berikut merupakan uraian tentang mikroskop stereo *Zoom Stereo Microscope*, Olympus SZ3060.

Keterangan gambar :

1. *Oculars eyepiece* (lensa okuler)
2. *Diopter adjustment ring* (cincin pengatur diopter)
3. *Zoom control knob* (sekrup pengatur pembesaran)
4. *Focusing knob* (sekrup pengatur fokus)
5. *Stage plate* (pelat tempat specimen diletakkan)
6. *Stage clip* (penjepit spesimen/preparat)

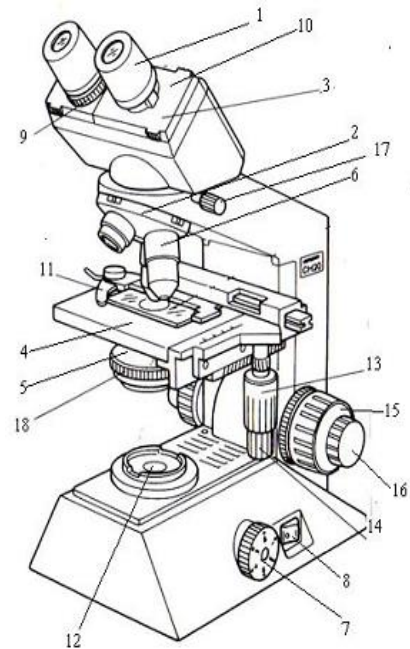
• Prosedur operasi

- a) Letakkan spesimen / preparat di stage plate (5), jepit jika perlu
- b) Atur perbesaran pada perbesaran terkecil dengan memutar *Zoom Control Knob* (3) kemudian dicari fokusnya dengan memutar *Focusing Knob* (4)
- c) Jika ingin mendapatkan bayangan yang lebih besar, putar *Zoom Control Knob* (3) ke perbesaran yang lebih tinggi kemudian dicari fokusnya.
- d) Mikroskop ini memiliki pilihan perbesaran:

Okuler	Objektif	total
10 x	0,67 x	6,7 x
	0,9 x	9 x
	1 x	10 x
	2 x	20 x
	4 x	40 x

b. Bagian-bagian Mikroskop:

1. *Eye piece/oculars* (lensa okuler), memperbesar bayangan yang dibentuk lensa objektif
2. *Revolving nosepiece* (pemutar lensa objektif), memutar objektif sehingga mengubah perbesaran
3. *Observation tube* (tabung pengamatan / tabung okuler)
4. *Stage* (meja benda), spesimen diletakkan di sini
5. *Condenser* (condenser), mengumpulkan cahaya supaya tertuju ke lensa objektif
6. *Objective lense* (lensa objektif), memperbesar spesimen
7. *Brightness adjustment knob* (pengatur kekuatan lampu)
8. *Main switch* (tombol on-off)
9. *Diopter adjustmet ring* (cincin pengatur diopter), menyamakan focus antara mata kanan dan kiri
10. *Interpupillar distance adjustment knob* (pengatur jarak interpupillar)
11. *Specimen holder* (penjepit spesimen)
12. *Illuminator* (sumber cahaya)
13. *Vertical feed knob* (sekrup pengatur vertikal), menaikkan atau menurunkan *object glass*
14. *Horizontal feed knob* (sekrup pengatur horizontal), menggeser ke kanan / kiri objek glas
15. *Coarse focus knob* (sekrup fokus kasar), menaik-turunkan meja benda (untuk mencari fokus) secara kasar dan cepat
16. *Fine focus knob* (sekrup fokus halus), menaik turunkan meja benda secara halus dan lambat
17. *Observation tube securing knob* (sekrup pengencang tabung okuler)
18. *Condenser adjustment knob* (sekrup pengatur kondenser), menaik-turunkan kondenser



c. Prosedur Operasi

1. Menyalakan lampu
 - a) tekan tombol on (8)
 - b) atur kekuatan lampu dengan memutar bagian (7)
2. Menempatkan spesimen pada meja benda
 - a) Letakan objek glas diatas meja benda (4) kemudian jepit dengan (11). Jika meja benda belum turun, diturunkan dengan sekrup kasar (15)
 - b) Cari bagian dari objek glas yang terdapat preparat ulas (dicari dan diperkirakan memiliki gambar yang jelas) dengan memutar sekrup vertikal dan horizontal (13) dan (14)
3. Memfokuskan
 - a) Putar *Revolving nosepiece* (2) pada perbesaran objektif 4x lalu putar sekrup kasar (15) sehingga meja benda bergerak ke atas untuk mencari fokus
 - b) Setelah fokus perbesaran 4 x 10 didapatkan, maka putar (2) pada perbesaran selanjutnya yaitu perbesaran objektif 10x. kemudian putar sekrup halus (16) untuk mendapatkan fokusnya
 - c) Lakukan hal yang sama jika menggunakan perbesaran yang lebih tinggi

Berikut adalah tabel yang menunjukkan jarak antara spesimen dengan lensa objektif jika fokus telah didapatkan

Perbesaran objektif	4x	10x	40x	60x
Jarak A (mm)	29	6,3	0,53	0,29

Catatan: Setelah mendapattkan fokus pada perbesaran tertentu, misal 40x, dan ingin memutar objektif ke perbesaran 100x, maka meja benda tidak perlu diturunkan dan tidak perlu khawatir bahwa lensa objektif akan menggesek *cover glass* karena terdapat sisa jarak A yang lebih kecil antara *cover glass* dengan lensa objektif (lihat tabel diatas).

d. Tambahan

1. Jika perlu *interpupillar distance adjustment knob* (10) dapat digeser, hal ini akan mengubah dua bayangan yang akan diterima oleh 2 mata menjadi gambar yang tunggal sehingga sangat membantu dalam mengatasi kelelahan mata
2. Jika perlu *diopter adjustment knob* (9) dapat diatur untuk memperoleh bayangan focus yang seimbang antara mata kanan dan kiri
3. Pengaturan *condenser* (5) akan memperjelas bayangan yang tampak dengan mensetting pada posisi tertinggi (cahaya penuh)

e. Perbesaran total

Ukuran specimen yang diamati dapat diperoleh dengan mengalikan perbesaran lensa okuler dengan lensa objektif. Misal = Okuler (10x) x Objektif (40x) = 400x

f. Penggunaan minyak imersi

Semakin kecil nilai daya pisah, akan semakin kuat kemampuan lensa untuk memisahkan dua titik yang berdekatan pada preparat sehingga struktur benda terlihat lebih jelas. Daya pisah dapat diperkuat dengan memperbesarkan indeks bias

atau menggunakan cahaya yang memiliki panjang gelombang (λ) pendek. Biasanya dapat digunakan minyak imersi untuk meningkatkan indeks bias pada perbesaran 10 x 100

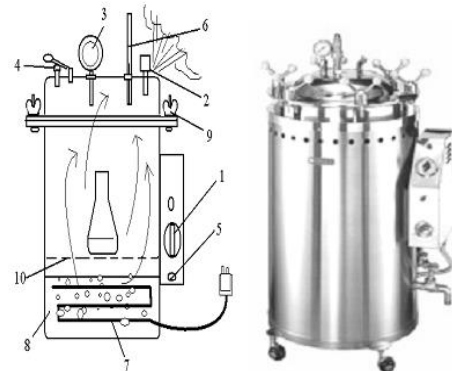
- 1) Jika fokus pada perbesaran 10 x 40 telah didapatkan maka putar ke perbesaran objektif 100x
- 2) tetesi minyak imersi 1 – 2 tetes dari sisi lensa
- 3) Jika telah selesai menggunakan mikroskop, bersihkan lensa objektif 100x dengan kertas lensa yang dibasahi xylol

2. Autoklaf (*Autoclave*)

Autoclave adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi² (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121°C.

Diagram autoklaf vertical

- a. Tombol pengatur waktu mundur (*timer*)
- b. Katup pengeluaran uap
- c. pengukur tekanan
- d. klep pengaman
- e. Tombol *on-off*
- f. Termometer
- g. Lempeng sumber panas
- h. Aquades (dH₂O)
- i. Sekrup pengaman
- j. batas penambahan air



Cara Penggunaan autoklaf adalah sebagai berikut:

- a. Sebelum melakukan sterilisasi cek dahulu banyaknya air dalam autoklaf. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Gunakan air hasil destilasi, untuk menghindari terbentuknya kerak dan karat.
- b. Masukkan peralatan dan bahan. Jika mensterilisasi botol beretutup ulir, maka tutup harus dikendorkan.
- c. Tutup autoklaf dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu.
- d. Nyalakan autoklaf, diatur timer dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C.
- e. Tunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan) dan tunggu sampai selesai. Penghitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm.
- f. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka tunggu tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum pada *pressure gauge* menunjuk ke angka nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan keluarkan isi autoklaf dengan hati-hati.

3. Inkubator (*Incubator*)



Inkubator adalah alat untuk menginkubasi atau memeram mikroba pada suhu yang terkontrol. Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu dan pengatur waktu. Kisaran suhu untuk inkubator produksi Heraeus B5042 misalnya adalah 10-70°C.

4. Alat-alat lain (Gelas, non gelas & keramik)

a. Cawan Petri (*Petri Dish*)



Cawan petri berfungsi untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganisme. Medium dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran, diameter cawan yang biasa berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml.

b. Pipet Ukur (*Measuring Pippete*)



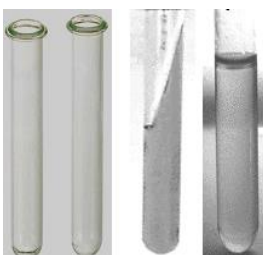
Pipet ukur merupakan alat untuk memindahkan larutan dengan volume yang diketahui. Tersedia berbagai macam ukuran kapasitas pipet ukur, diantaranya pipet berukuran 1 ml, 5 ml dan 10 ml. Cara penggunaannya adalah cairan disedot dengan pipet ukur dengan bantuan *filler* sampai dengan volume yang diinginkan. Volume yang dipindahkan dikeluarkan mengikuti skala yang tersedia (dilihat bahwa skala harus tepat sejajar dengan meniskus cekung cairan) dengan cara menyamakan tekanan *filler* dengan udara sekitar.

c. Pipet Tetes (*Pasteur Pippete*)



Fungsinya sama dengan pipet ukur, namun volume yang dipindahkan tidak diketahui. Salah satu penerapannya adalah dalam menambahkan HCl / NaOH saat mengatur pH media, penambahan reagen ada uji biokimia, dll.

d. Tabung reaksi (*Test Tube*)



Di dalam mikrobiologi, tabung reaksi digunakan untuk uji-biokimiawi dan menumbuhkan mikroba. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil. Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (*deep tube agar*) dan agar miring (*slants agar*). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas

permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi. Untuk alasan efisiensi, media yang ditambahkan berkisar 10-12 ml tiap tabung.

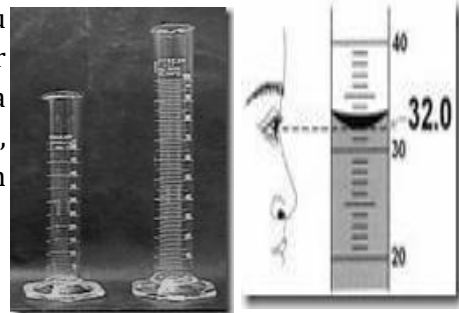
e. Labu Erlenmeyer (*Erlenmeyer Flask*)



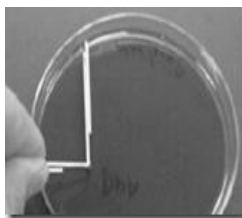
Berfungsi untuk menampung larutan, bahan atau cairan yang. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, kultivasi mikroba dalam kultur cair, dll. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya yaitu 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml, dsb.

f. Gelas ukur (*Graduated Cylinder*)

Berguna untuk mengukur volume suatu cairan, seperti labu erlenmeyer, gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya volume tersebut ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan.



g. Batang L (*L Rod/Drugalsky*)



Batang L bermanfaat untuk menyebarkan cairan di permukaan agar supaya bakteri yang tersuspensi dalam cairan tersebut tersebar merata. Alat ini juga disebut *spreader*.

h. Mortar dan *Pestle*



Mortar dan penumbuk (*pastle*) digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi cuplikan, misal daging, roti atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.

i. *Beaker Glass*

Beaker glass merupakan alat yang memiliki banyak fungsi. Di dalam mikrobiologi, dapat digunakan untuk preparasi media media, menampung akuades dll.



j. Pembakar Bunsen (*Bunsen Burner*)

Salah satu alat yang berfungsi untuk menciptakan kondisi yang steril adalah pembakar bunsen. Untuk sterilisasi jarum ose atau yang lain, bagian api yang paling cocok untuk memijarkannya adalah bagian api yang berwarna biru (paling panas). Perubahan bunsen dapat menggunakan bahan bakar gas atau metanol.



k. *Glass Beads*

Glass Beads adalah manik-manik gelas kecil yang digunakan untuk meratakan suspensi biakan dengan menyebarkan beberapa butir di atas permukaan agar dan digoyang merata. *Glass beads* digunakan pada teknik *spread plate* yang fungsinya sama dengan batang L atau *Spreader*.

l. Tabung Durham

Tabung durham berbentuk mirip dengan tabung reaksi namun ukurannya lebih kecil dan berfungsi untuk menampung/menjebak gas yang terbentuk akibat metabolisme pada bakteri yang diujikan. Penempatannya terbalik dalam tabung reaksi dan harus terendam sempurna dalam media (jangan sampai ada sisa udara).

m. Jarum Inokulum

Jarum inokulum berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nichrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (*loop*) dan disebut ose atau *inoculating loop*/*transfer loop*, dan yang berbentuk lurus disebut *inoculating needle*/*Transfer needle*. *Inoculating loop* cocok untuk melakukan *streak* di permukaan agar, sedangkan *inoculating needle* cocok digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (*stab inoculating*). Jarum inokulum ini akan sangat bermanfaat saat membelah agar untuk preprasi *Heinrich's Slide Culture*.



n. Pinset



Pinset memiliki banyak fungsi diantaranya adalah untuk mengambil benda dengan menjepit misalnya saat memindahkan cakram antibiotik.

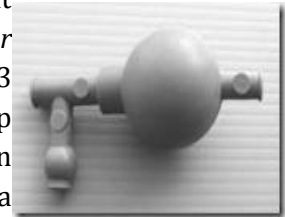
o. pH Indikator Universal

berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada media berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.



p. Pipet Filler / Rubber Bulb

Filler adalah alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur. Karet sebagai bahan *filler* merupakan karet yang resisten bahan kimia. *Filler* memiliki 3 saluran yang masing-masing saluran memiliki katup. Katup yang bersimbol A (*aspirate*) berguna untuk mengeluarkan udara dari gelembung. S (*suction*) merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas.



Kemudian katup E (*exhaust*) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur.

III. Metode

1. Sosialisasi Lab Safety untuk Mikrobiologi

Baca dan diskusikan keterangan di bawah ini, selanjutnya coba lakukan.

- Cuci tangan dengan sabun disinfektan dan semprot dengan alkohol 70% ketika masuk ke laboratorium dan lakukan lagi sebelum meninggalkan laboratorium.
- Tidak makan dan minum atau membawa makanan, minum, permen karet, maupun merokok di laboratorium. Jangan menaruh apapun di mulut anda seperti pensil, pena, label, atau jari. Tidak menyimpan makanan di daerah mana mikroorganisme disimpan.
- Menggunakan jas lab atau kemeja lengan panjang yang kancingnya tertutup. Jas lab harus menutupi lengan dan dapat dilepas tanpa menariknya keatas kepala.
- Jaga ruang kerja bebas dari semua bahan yang tidak perlu. Ransel, dompet, dan mantel harus ditempatkan dalam rak atau loker diluar lab.
- Mendisinfeksi area kerja sebelum dan sesudah digunakan dengan etanol 70% atau klorin 10%. Peralatan laboratorium dan permukaan kerja harus didekontaminasi dengan disinfektan yang tepat secara rutin, dan terutama setelah tumpahan, cipratan, maupun kontaminasi lainnya.
- Berilabel segalanya dengan jelas.
- Kencangkan tutup pada reagen, botol solusi, dan kultur bakteri. Jangan membuka cawan Petri (yang berisi kultur) di dalam laboratorium kecuali benar-benar diperlukan.
- Inokulasi loop dan jarum (ose) harus disterilkan dalam api (pembakar) Bunsen hingga membara sebelum disimpan.
- Matikan pembakar Bunsen bila tidak digunakan.
- Jika menggunakan Bunsen dengan bahan bakar seperti gas atau alkohol, pastikan tidak ada kertas dibawah atau didekatnya.
- Perlakukan semua mikroorganisme sebagai patogen potensial. Gunakan peralatan dan alat pelindung diri yang tepat dan tidak membawa kultur keluar dari laboratorium.
- Kenakan sarung tangan sekali pakai saat bekerja dengan mikroba yang berpotensi menular atau mengkontaminasi (misalnya sampel limbah).

- m. Sterilkan peralatan dan bahan yang akan digunakan.
- n. Jangan pipet melalui mulut. Gunakan bantuan bulub atau pipettors volume disesuaikan. [Di masa lalu, beberapa personel laboratorium diajarkan memipet dengan mulut. Praktek ini telah menyebabkan banyak personil (analisis) laboratorium terinfeksi. Dengan tersedianya perangkat pipetting mekanik, memipet dengan mulut sangat dilarang.]
- o. Perhatikan istilah-istilah yang digunakan:
 - 1. Bahan Infeksi : bahan yang mengandung mikroorganisme hidup (bakteri, virus, riketsia, parasit, jamur) yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia & hewan
 - 2. Spesimen : setiap bahan yang berasal dari manusia & hewan (ekskreta, sekreta, darah dll) dan bahan yang bukan dari manusia, dikirim untuk tujuan pemeriksaan
 - 3. Sterilisasi : Inaktivasi total semua kehidupan mikroorganisme untuk berkembang biak
 - 4. Desinfeksi : tindakan yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme penyebab infeksi
 - 5. Desinfektan : zat yang dapat membunuh mikroorganisme penyebab infeksi
 - 6. Dekontaminasi : tindakan untuk menghilangkan pencemaran pada alat, ruangan lab atau bahan bekas pakai (cair/padat)
 - 7. Limbah Lab : Bahan bekas pakai pada pekerjaan di Lab berupa limbah cair, padat & gas.
- p. Pertimbangkan segalanya Biohazard. Tidak menuangkan sesuatu ke dalam wastafel, seperti media kaldu/broth. kultur dalam media broth atau media agar harus didesturksi/disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf sebelum dibuang.
- q. Masukkan semua materi sampah dalam kantong biohazard dan autoklaf sebelum dibuang dalam tempat sampah biasa.
- r. Mengetahui lokasi atau tempat peralatan keselamatan di laboratorium (misalnya, shower pencuci mata, shower, wastafel, pemadam kebakaran, kabinet keamanan biologis, pertolongan pertama, katup gas darurat, dll).
- s. Buang pecahan kaca dalam wadah kaca yang pecah.

2. Pengenalan Alat Lab Mikrobiologi

Alat : semua alat yang ada di lab mikrobiologi

Cara kerja: Perhatikan, catat dan cobalah fungsi dan penggunaan masing-masing alat

3. Pengamatan Mikroorganisme Langsung

• Preparat Basah

Alat: Mikroskop cahaya, kaca obyek.

Bahan: Alkohol, kapas, tusuk gigi.

Cara membuat preparat basah :

- 1) Kaca obyek dibersihkan dengan kapas yang diberi alkohol.
- 2) Keriklah lapisan pada sela-sela gigi menggunakan tusuk gigi dan pindahkan ke atas kaca obyek. Gunakan kaca obyek biasa.
- 3) Tutuplah dengan kaca penutup.
- 4) Periksa dengan perbesaran 10x atau 45x.
- 5) Laporkan hasil pengamatan.

- **Preparat Tetes Bergantung**

Pada preparat tetes bergantung mikroba yang diamati adalah juga mikroba hidup. Keuntungannya adalah tidak mudah kering.

Alat: Mikroskop cahaya, kaca obyek & kaca penutup

Bahan: suspensi biakan, Vaseline, tusuk gigi

Cara membuat preparat tetes bergantung:

- 1) Beri vaselin pada sudut-sudut kaca penutup dengan tusuk gigi.
- 2) Taruhlah suspensi biakan mikroba di bagian tengah kaca penutup.
- 3) Kaca obyek diletakkan di atas kaca penutup, kemudian balikkan dengan cepat.
- 4) Periksa dengan perbesaran 10x dan 45x.

- **Teknik Penggunaan Minyak Imersi**

Pengamatan mikroorganisme yang diwarnai menggunakan lensa obyektif perbesaran kuat (100x) dengan bantuan minyak imersi.

Alat: mikroskop cahaya,

Bahan: preparat awetan, minyak imersi

Cara penggunaannya:

- 1) Bersihkan lensa okuler dengan kain halus.
- 2) Tempatkan meja obyek pada posisi datar.
- 3) Naikkan kondensor sampai menyentuh meja obyek.
- 4) Letakkan 1 tetes minyak imersi di atas kaca obyek.
- 5) Lensa obyektif 100x diturunkan dengan pengatur kasar hingga menyentuh minyak imersi.
- 6) Fokus diatur dengan pengatur halus.
- 7) Kontras bakteri dengan sekelilingnya diperoleh dengan mengatur diafragma.

Setelah selesai menggunakan mikroskop atau akan meninggalkan laboratorium, lakukan prosedur berikut:

- a. Turunkan kaca obyek dari meja obyek.
- b. Bersihkan lensa obyektif dengan xylol.
- c. Tempatkan lensa obyektif dengan perbesaran terkecil pada posisi di atas kondensor.
- d. Kembalikan mikroskop ke dalam kotaknya dan masukkan ke lemari mikroskop.

IV. Jurnal Praktikum

Judul :

Tujuan :

a. Alat dan bahan yang digunakan

b. Cara kerja

V. Pertanyaan Diskusi

1. Menurut Anda mengapa perlu dilakukan acara pengenalan alat? Jelaskan.
2. Apa yang Anda lihat pada pengamatan mikroskop? Jelaskan bentuk-bentuk mikroorganisme yang Anda amati
3. Mengapa terdapat banyak mikroba di sela-sela gigi?

Praktikum 2	PEMBUATAN MEDIA PERTUMBUHAN MIKROBA	
----------------	--	---

I. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum, mahasiswa dapat :

1. Membuat media pertumbuhan bakteri *Nutrien Agar*, *Potato Dextrose Agar* dan *Nutrient Broth*.
2. Membuat media khusus (selektif dan differensial)

II. Pendahuluan

1. Media Pertumbuhan Mikroba

Pembiakan mikroorganisme dalam laboratorium memerlukan media yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai bagi mikroorganisme. Zat hara digunakan untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Lazimnya, media biakan mengandung air, sumber energi, zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen dan trace element. Dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleosida.

Media biakan yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri bisa bentuk padat, semipadat dan cair. Media padat diperoleh dengan menambahkan agar yang berasal dari ganggang merah. Agar digunakan sebagai pematat sebanyak 1,5-2%, karena tidak diuraikan oleh mikroorganisme dan membeku pada suhu di bawah 45°C.

Secara kimiawi, media biakan dibedakan menjadi media sintetik dan media nonsintetik. Pada media sintetik kandungan dan isi bahan yang ditambahkan diketahui secara terperinci. Media sintetik digunakan untuk mempelajari sifat fisiologis dan genetika mikroba. Senyawa anorganik dan organik yang ditambahkan dalam media harus murni, sehingga harganya seringkali mahal.

Media nonsintetik menggunakan bahan yang terdapat di alam yang biasanya tidak diketahui kandungan kimianya secara rinci. Contohnya ekstrak daging (beef extract), ekstrak kentang, pepton, ekstrak ragi (yeast extract) dan kaldu daging. Terkadang ditambahkan darah, serum, vitamin, asam amino atau nukleosida. Media non-sintetik sering digunakan di laboratorium mikrobiologi karena mudah disiapkan dan harganya relatif lebih murah. Selain itu dapat digunakan untuk membiakkan berbagai jenis mikroba.

2. Bahan-bahan media pertumbuhan

a. Bahan dasar

- air (H_2O) sebagai pelarut
- agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk pematat media. Agar sulit didegradasi oleh mikroorganisme pada umumnya dan mencair pada suhu 45°C.
- gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding agar.

- *Silica gel*, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pemadat media. Silica gel khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganisme autotrof obligat.
- b. Nutrisi atau zat makanan
- Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P; unsur mikro seperti Fe, Mg dan unsur pelikan/*trace element*.
- Sumber karbon dan energi yang dapat diperoleh berupa senyawa organik atau anorganik sesuai dengan sifat mikroba. Jasad heterotrof memerlukan sumber karbon organik antara lain dari karbohidrat, lemak, protein dan asam organik.
 - Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain. Sejumlah mikroba dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea.
 - Vitamin-vitamin.
- c. Bahan tambahan
- Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke medium dengan tujuan tertentu, misalnya *phenol red* (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba nontarget/kontaminan.
- d. Bahan yang sering digunakan dalam pembuatan media
- Agar, dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya adalah sebagai pemadat (*gelling*) yang pertama kali digunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membuat media. Jika dicampur dengan air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkannya harus diasuk dan dipanasi, pencairan dan pemadatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam
 - *Peptone*, adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya.
 - *Meat extract*. mengandung basa organik terbuat dari otak, limpa, plasenta dan daging sapi.
 - *Yeast extract*. terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alkohol. Yeast extract mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (*B complex*).
 - Karbohidrat, ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang umumnya digunakan adalah amilum, glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, manitol, dll. Konsentrasi yang ditambahkan untuk analisis fermentasi adalah 0,5-1%.

3. Macam-Macam Media Pertumbuhan

a. Medium berdasarkan sifat fisik

- Medium padat yaitu media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat.
- Medium setengah padat yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Misalnya bakteri

yang tumbuh pada media NfB (*Nitrogen free Bromthymol Blue*) semisolid akan membentuk cincin hijau kebiruan di bawah permukaan media, jika media ini cair maka cincin ini dapat dengan mudah hancur. Semisolid juga bertujuan untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media *Nitrate Broth*, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata diseluruh media.

- Medium cair yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (*Nutrient Broth*), LB (*Lactose Broth*).

2. Medium berdasarkan komposisi

- Medium sintesis yaitu media yang komposisi zat kimianya diketahui jenis dan takarannya secara pasti, misalnya *Glucose Agar*, *Mac Conkey Agar*.
- Medium semi sintesis yaitu media yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti, misalnya PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang mengandung agar, dekstrosa dan ekstrak kentang. Untuk bahan ekstrak kentang, kita tidak dapat mengetahui secara detail tentang komposisi senyawa penyusunnya.
- Medium non sintesis yaitu media yang dibuat dengan komposisi yang tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya, misalnya *Tomato Juice Agar*, *Brain Heart Infusion Agar*, *Pancreatic Extract*.

3. Medium berdasarkan tujuan

- Media untuk isolasi, mengandung semua senyawa esensial untuk pertumbuhan mikroba, misalnya *Nutrient Broth*, *Blood Agar*.
- Media selektif/penghambat, selain mengandung nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba lain dan merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Contohnya adalah Luria Bertani medium yang ditambah Amphisilin untuk merangsang *E.coli* resisten antibiotik dan menghambat kontaminan yang peka, *Ampiciline*. *Salt broth* yang ditambah NaCl 4% untuk membunuh *Streptococcus agalactiae* yang toleran terhadap garam.
- Media diperkaya (*enrichment*), media yang mengandung komponen dasar untuk pertumbuhan mikroba dan ditambah komponen kompleks seperti darah, serum, kuning telur. Media diperkaya juga bersifat selektif untuk mikroba tertentu. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media ini tidak hanya membutuhkan nutrisi sederhana untuk berkembang biak, tetapi membutuhkan komponen kompleks, misalnya *Blood Tellurite Agar*, *Bile Agar*, *Serum Agar*, dll.
- Media untuk peremajaan kultur, Media umum atau spesifik yang digunakan untuk peremajaan kultur
- Media untuk menentukan kebutuhan nutrisi spesifik. Media ini digunakan untuk mendiagnosis atau menganalisis metabolisme suatu mikroba. Contohnya adalah *Koser's Citrate medium*, yang digunakan untuk menguji kemampuan menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon.
- Media untuk karakterisasi bakteri. Media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan spesifik suatu mikroba. Kadang-kadang indikator ditambahkan untuk menunjukkan adanya perubahan kimia. Contohnya adalah *Nitrate Broth*, *Lactose Broth*, *Arginine Agar*.

- Media diferensial, Media ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari campurannya berdasar karakter spesifik yang ditunjukkan pada media diferensial, misalnya TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) yang mampu memilih Enterobacteria berdasarkan bentuk, warna, ukuran koloni dan perubahan warna media di sekeliling koloni.

III. Metode

❖ Acara Praktikum: Pembuatan Media Umum

1. Nutrient Agar

Bahan	
<i>Beef extract</i>	3 gram
<i>Pepton</i>	5 gram
Agar	15 gram
Akuades	1000 ml

Prosedur :

- Siapkan gelas *Beker* dan masukkan 1000 ml akuades letakkan di atas lempeng pemanas.
- Tambahkan *pepton*, *beef extract* dan agar. Aduk-aduk hingga mendidih.
- Saring dan sterilkan dengan autoklaf (121°C, 15 lbs).
- Untuk membuat agar tegak, masukkan 10 ml media ke dalam tabung reaksi steril menggunakan pipet ukur steril. Letakkan dalam posisi tegak.
- Untuk membuat agar miring masukkan 5 ml media ke dalam tabung reaksi steril. Letakkan dalam posisi miring sebelum membeku.
- Untuk membuat agar lempeng, masukkan 15 ml media ke dalam cawan petri steril.

2. Nutrient Broth

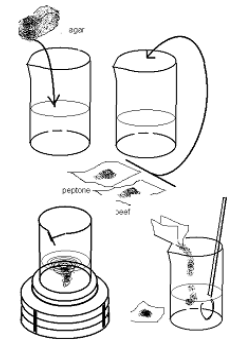
Bahan	
<i>Beef extract</i>	3 gram
<i>Pepton</i>	5 gram
Akuades	1000 ml

Prosedur :

- Siapkan gelas *Beker* di atas lempeng pemanas dan masukkan 1000 ml akuades.
- Tambahkan *pepton* dan *beef extract*. Aduk-aduk hingga mendidih.
- Saring dan sterilkan dengan autoklaf (121°C, 15 lbs).
- NB dapat diletakkan dalam labu erlenmeyer steril bertutup kapas ataupun tabung reaksi steril.

3. Potato Dextrose Agar

Bahan	
Kentang	300 gram
Agar	20 gram
Dextrose/gula lain	20 gram
Ekstrak ragi	5 gram
Akuades	1000 ml



Prosedur:

- a. Potong-potong kentang hingga ukuran 1-1,5 cm³. Rebus kentang dalam air selama 1 jam sambil diaduk-aduk. Saring dan tambahkan bahan-bahan lain sambil dipanaskan dan diaduk.
- b. Masukkan masing-masing 15 ml PDA ke dalam beberapa tabung reaksi dan sisanya ke dalam labu erlenmeyer.
- c. Sterilisasi dengan autoklaf (121oC, 15 lbs).
- d. Setelah agak dingin tapi belum membeku, masukkan ke dalam cawan petri steril. Siap untuk diinokulasikan.

IV. Jurnal Praktikum

Acara Praktikum :
Judul :
Tujuan :
Hipotesis :

a. Alat dan bahan yang digunakan

b. Cara kerja

c. Hasil pengamatan

c. Analisis

V. Pertanyaan Diskusi

1. Menurut Anda mengapa perlu dilakukan pembuatan media pertumbuhan mikroba? Jelaskan.
2. Apakah terdapat kesulitan ketika membuat media pertumbuhan? Jelaskan.



I. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum, mahasiswa dapat:

1. Melakukan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan di praktikum
2. Melakukan setiap langkah prosedur bekerja secara aseptik
3. Melakukan isolasi mikroba dengan metode agar tuang, agar sebar dan goresan agar.
4. Melakukan pemurnian dengan metode gores pada agar miring dan dapat menumbuhkan satu jenis bakteri secara murni

II. Pendahuluan

Media harus disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Bila tidak, dalam beberapa hari akan tumbuh mikroba pencemar (kontaminan) dan menyebabkan kerusakan pada media. Proses sterilisasi berguna untuk membunuh dan mengenyahkan semua organisme hidup yang terdapat dalam media. Setelah disterilkan media biakan siap digunakan.

Dalam tabung, media biakan panas yang berisi agar seringkali ditempatkan dalam kondisi miring disebut agar miring. Selain itu, media biakan juga dapat ditempatkan pada cawan petri sehingga tersedia permukaan lebih luas untuk pertumbuhan mikroorganisme. Media biakan yang telah disterilkan harus diberi penutup agar tidak tercemar (terkontaminasi) mikroorganisme yang ada di sekelilingnya.

Pada prinsipnya sterilisasi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu secara mekanik, fisik dan kimiawi.

- a. Sterilisasi secara mekanik (filtrasi) menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil (0.22 mikron atau 0.45 mikron) sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik.
- b. Sterilisasi secara fisik dapat dilakukan dengan pemanasan & penyinaran.

❖ Pemanasan

- 1) Pemijaran (dengan api langsung): membakar alat pada api secara langsung, contoh: jarum inokulum, pinset, batang L, dll.
- 2) Panas kering: sterilisasi dengan oven kira-kira 60-180°C. Sterilisasi panas kering cocok untuk alat yang terbuat dari kaca misalnya erlenmeyer, tabung reaksi dll.
- 3) Uap air panas: konsep ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini supaya tidak terjadi dehidrasi.
- 4) Uap air panas bertekanan: menggunakan autoklaf

❖ Penyinaran dengan UV

Sinar Ultra Violet juga dapat digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan interior Safety

- c. Sterilisasi secara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan antara lain alkohol.

Di laboratorium, sterilisasi media menggunakan uap panas bertekanan dengan suhu 121°C dan tekanan 15 lbs (2 atm) selama 15 menit menggunakan alat autoklaf. Cairan yang tidak tahan panas, misalnya urea, berbagai macam karbohidrat dan serum, dapat disterilkan dengan menggunakan berbagai macam saringan. Lazimnya saringan yang digunakan mempunyai pori-pori sebesar 0,45 µm.

Di alam populasi mikroba tidak terpisah sendiri menurut jenisnya, tetapi terdiri dari campuran berbagai macam sel. Di laboratorium populasi bakteri ini dapat diisolasi menjadi kultur murni yang terdiri dari satu jenis yang dapat dipelajari morfologi, sifat dan kemampuan biokimiawinya.

Mengisolasi mikroba dapat dilakukan dengan beberapa cara/teknik. Pada dasarnya kita akan menumbuhkan sampel mikroba dari suatu bahan. Oleh sebab itu, yang pertama harus disiapkan adalah bahan yang akan diambil sampelnya.

1. Teknik Pengambilan Sampel

Sebelum melakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pengambilan sampel. Berikut merupakan prosedur pengambilan sampel.

a. Sampel tanah

Jika mikroorganisme yang diinginkan kemungkinan berada di dalam tanah, maka cara pengambilannya disesuaikan dengan tujuan dan kebutuhan. Misal jika yang diinginkan mikroorganisma rhizosfer maka sampel diambil dari sekitar perakaran dekat permukaan hingga ujung perakaran.

b. Sampel air

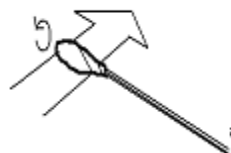
Pengambilan sampel air bergantung kepada keadaan air itu sendiri. Jika berasal dari air sungai yang mengalir maka botol dicelupkan miring dengan bibir botol melawan arus air. Bila pengambilan sampel dilakukan pada air yang tenang, botol dapat dicelupkan dengan tali, jika ingin mengambil sampel dari air keran maka sebelumnya keran dialirkan dulu beberapa saat dan mulut kran dibakar.

2. Isolasi Dengan Cara Pengenceran (Dilution)

a. Teknik Preparasi Suspensi

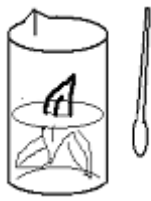
Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya. Macam-macam preparasi bergantung kepada bentuk sampel :

1) Swab (ulas)



Dilakukan menggunakan cotton bud steril pada sampel yang memiliki permukaan luas dan pada umumnya sulit dipindahkan atau sesuatu pada benda tersebut. Contohnya adalah meja, batu, batang kayu dll. Caranya dengan mengusapkan cotton bud memutar sehingga seluruh permukaan kapas dari cotton bud kontak dengan permukaan sampel. Swab akan lebih baik jika cotton bud dicelupkan terlebih dahulu ke dalam larutan atraktan semisal pepton water.

2) Rinse (bilas)



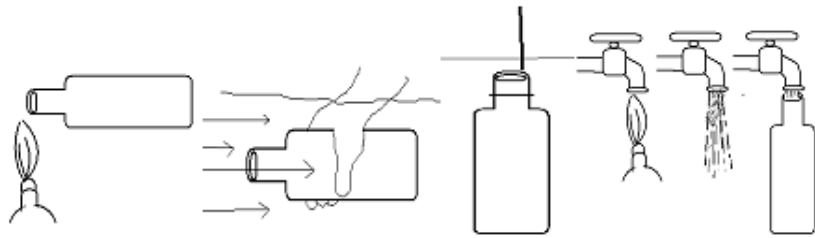
terdapat dalam beaker glass.

Ditujukan untuk melarutkan sel-sel mikroba yang menempel pada permukaan substrat yang luas tapi relatif berukuran kecil, misalnya daun bunga dll. Rinse merupakan prosedur kerja dengan mencelupkan sampel ke dalam akuades dengan perbandingan 1:9 (w/v). Contohnya sampel daun diambil dan ditimbang 5 g kemudian dibilas dengan akuades 45 ml yang

3) Maseration (pengancuran)

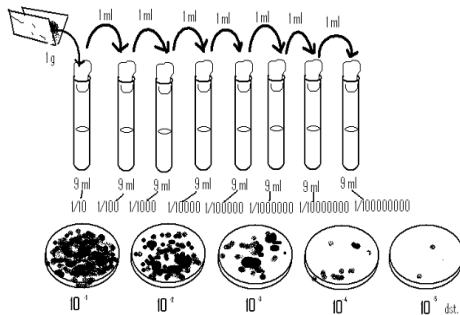


Sampel yang berbentuk padat dapat ditumbuk dengan mortar



dan pestle sehingga mikroba yang ada dipermukaan atau di dalam dapat terlepas kemudian dilarutkan ke dalam air. Contoh sampelnya antara lain bakso, biji, buah dll. Perbandingan antar berat sampel dengan pengenceran pertama adalah 1:9 (w/v). Untuk sampel dari tanah tak perlu dimaserasi.

3. Teknik Pengenceran Bertingkat



Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Digunakan perbandingan 1:9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari

pengenceran sebelumnya.

Cara Kerja :

- Sampel yang mengandung bakteri dimasukan ke dalam tabung pengenceran pertama (1/10 atau 10^{-1}) secara aseptis (dari preparasi suspensi). Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1:9 dan ingat akuades yang digunakan jika memakai teknik rinse dan swab sudah termasuk pengencer 10^{-1} . Setelah sampel masuk lalu dilarutkan dengan mengocoknya (pengocokan yang benar dapat dilihat pada gambar disamping)
- Diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemindahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, hal yang perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan

pipet ukur steril yang berbeda/baru. Prinsipnya bahwa pipet tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.

4. Teknik Penanaman

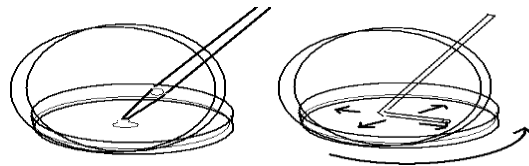
a. Teknik penanaman/inokulasi dari suspensi

Teknik penanaman ini merupakan lajutan dari pengenceran bertingkat. Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil beberapa tabung pengenceran terakhir.

1) Spread Plate (agar sebar/tabur ulas)

Spread plate adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar diperoleh kultur murni. Adapun prosedur kerja yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut :

- Ambil suspensi cairan senamyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.
- Batang L atau batang drugal diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menggosokannya pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.
- Hal yang perlu diingat bahwa batang L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel-sel mikroorganisme dapat mati karena panas.

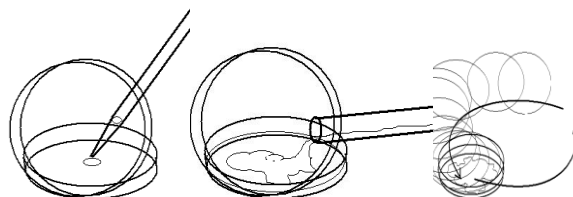


2) Pour Plate (agar tuang)

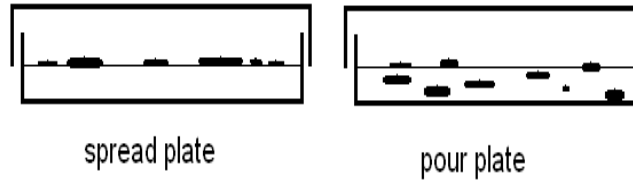
Teknik ini memerlukan agar yang belum padat ($>45^{\circ}\text{C}$) untuk dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri lalu kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar saja melainkan sel terendam agar (di dalam agar).

Sehingga terdapat sel yang tumbuh dipermukaan agar yang kaya O_2 dan ada yang tumbuh di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung oksigen. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ($>45^{\circ}\text{C}$)
- Teteskan 1 ml secara aseptis. suspensi sel kedalam cawan kosong
- Tuangkan media yang masih cair ke cawan kemudian putar cawan untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian diinkubasi.



Alasan diteteskannya bakteri sebanyak 0,1 ml untuk spread plate dan 1 ml untuk pour plate karena spread plate ditujukan untuk menumbuhkan dipermukaanya saja, sedangkan *pour plate* membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak dari pada *spread plate*.



III. Metode

❖ Acara Praktikum: Sterilisasi Menggunakan Autoklaf.

Prosedur

- Buka pintu penutup autoklaf kemudian masukkan alat dan bahan yang akan disterilkan setelah dibungkus dengan kertas.
- Tambahkan air sampai garis batas pengisian air.
- Tutup pintu dan kencangkan sekrupnya.
- Nyalakan api dari kompor gas dan tunggu hingga air di dalam autoklaf mnedidih ditandai dengan keluarnya uap air.
- Setelah beruap tutup kran exhaust dan perhatikan layar suhu dan tekanan harus sesuai dengan 121°C dan 15 lbs.
- Setelah suhu dan tekanan udara menunjukkan 121oC dan 15 lbs, hitung waktu sterilisasi selama 15 menit. Setelah 15 menit matikan api. Buka keran exhaust untuk mengeluarkan uap, tunggu hingga tekanan menunjukkan angka 0.
- Buka pintu autoklaf setelah ditunggu hingga agak dingin, lalu keluarkan alat dan bahan yang telah steril.
- Simpan media biak yang telah disterilkan dalam incubator selama 2-3 x 24 jam. Amati adanya pertumbuhan koloni bakteri maupun jamur. Jika tidak ada pertumbuhan berarti sterilisasi berhasil dengan baik.

❖ Sterilisisasi dengan Tyndalisasi

Konsep kerja metode ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air dan tidak tahan tekanan atau suhu tinggi lebih tepat disterilkan dengan metode ini. Misalnya susu yang disterilkan dengan suhu tinggi akan mengalami koagulasi dan bahan yang berpati disterilkan pada suhu bertekanan pada kondisi pH asam akan terhidrolisis.

Cara kerja :

- Bahan dimasukkan kedalam erlenmeyer atau botol dan ditutup rapat dengan sumbat atau aluminium foil.
- Erlenmeyer/botol lalu dimasukkan kedalam alat sterilisasi (alat standar menggunakan *Arnold Steam Sterilizen* atau dandang).
- Nyalakan sumber panas dan tunggu hingga termometer menunjukkan suhu 100°C kemudian hitung waktu mundur hingga 30 menit (uap panas yang terbentuk akan mematikan mikroba).
- Setelah selesai alat sterilisasi dimatikan dan bahan yang steril dikeluarkan.

- Setelah 24 jam, bahan tersebut di sterilkan lagi dengan cara yang sama, sedang waktu ini dimaksudkan untuk memberi kesempatan spora atau sel vegetatif yang belum mati untuk tumbuh sehingga mudah dibunuh.

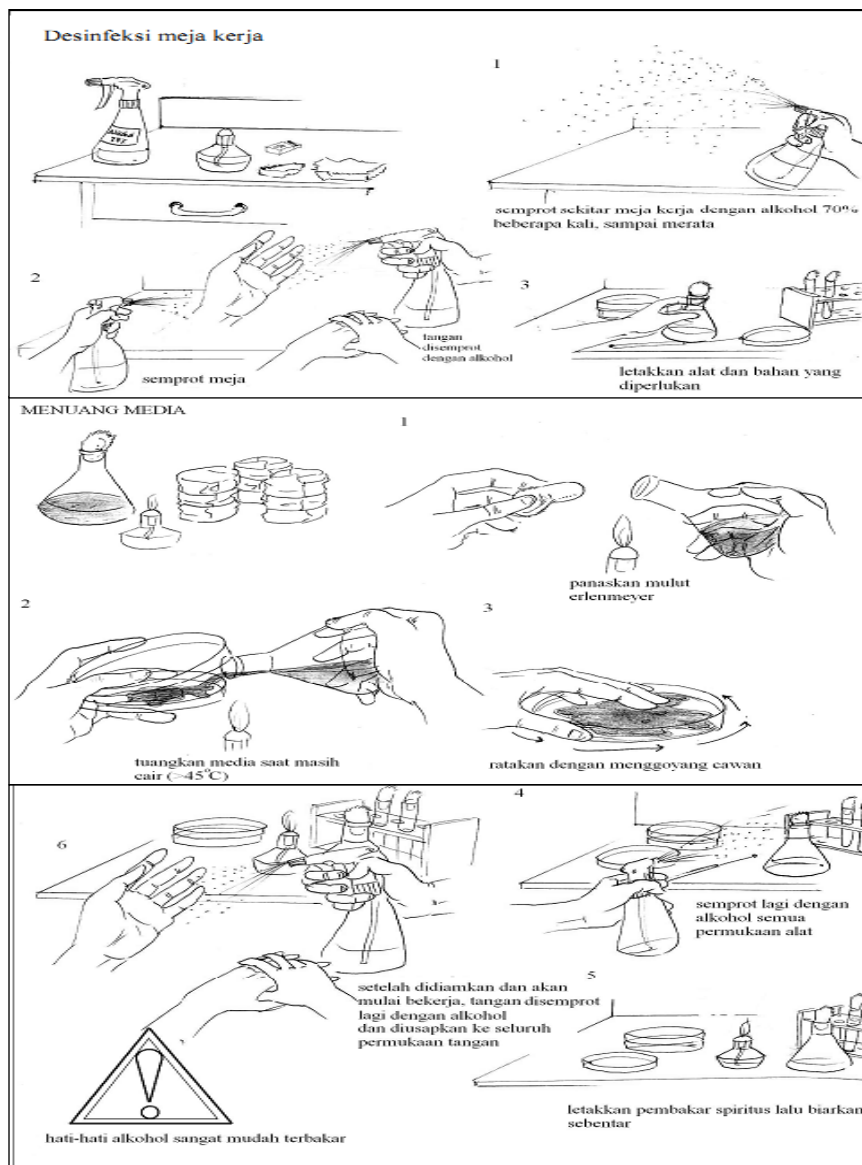
❖ Sterilisasi dengan udara panas (Dry heat sterilization)

Sterilisasi dengan metode ini biasanya digunakan untuk peralatan gelas seperti cawan petri, pipet ukur dan labu erlenmeyer. Alat gelas yang disterilisasi dengan udara panas tidak akan timbul kondensasi sehingga tidak ada tetes air (embun) didalam alat gelas.

- Bungkus alat-alat gelas dengan kertas atau aluminium foil
- Atur pengatur suhu oven menjadi 180°C dan alat disterilkan selama 2-3 jam.

❖ Bekerja secara aseptis

Berbagai prosedur umum kerja dalam mikrobiologi membutuhkan teknik aseptis, seperti menuang media atau memindahkan biakan. Berikut dijelaskan teknik bekerja dengan cara aseptis.



Acara Praktikum: Isolasi Mikroba

Cara kerja:

1. Metode Agar Tuang (*Pour Plate*)

- a. Siapkan bahan yang akan diambil sampelnya. Siapkan pula 9 ml akuades dalam tabung reaksi steril.
- b. Usapkan cotton bud steril ke permukaan sampel dan celupkan ke dalam akuades atau potong 1 gram sampel menggunakan pisau/gunting steril dan masukkan ke dalam akuades steril. Kocok hingga homogen.
- c. Ambil 1 ml larutan dan masukkan ke dalam 9 ml akuades steril yang kedua. Lakukan hal yang sama beberapa kali sesuai kebutuhan hingga diperoleh pengenceran yang dikehendaki.
- d. Ambil 0,1 ml larutan sampel dan masukkan ke dalam cawan petri secara steril yaitu dengan mendekatkan mulut tabung ataupun cawan petri yang terbuka pada lampu bunsen.
- e. Tuangkan medium agar steril yang belum membeku (45°C) tapi tak sampai membunuh mikroba.
- f. Biarkan medium membeku dan inkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24-48 jam.

2. Metode Agar Sebar (*Spread Plate*)

- a. Lakukan langkah 1-3 pada metode agar tuang.
- b. Ambil 1 ml larutan dan tuangkan ke dalam cawan petri berisi medium agar yang sudah mengeras. Sebarkan larutan di atas medium menggunakan drugalski yang sudah disterilkan dengan melewatkannya pada api bunsen.
- c. Beri label, bungkus dengan kertas dan inkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24-48 jam.

3. Metode Goresan Agar (*Streak Plate*)

- a. Panaskan ujung ose hingga berpijar dan dinginkan.
- b. Tempelkan ose pada bahan yang akan diambil sampelnya. Tetaplah berada di sekitar api bunsen agar tetap steril.
- c. Buka cawan petri berisi medium agar padat steril dan goreskan ose secara sinambung pada permukaan medium.
- d. Beri label, bungkus dengan kertas dan inkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24-48 jam.

Acara Praktikum: Pemindahbiakan dan Pemurnian

Cara kerja:

1. Dari agar cawan ke agar cawan

- a. Siapkan cawan petri berisi biakan hasil isolasi. Pilih koloni-koloni yang akan dipindahkan.
- b. Siapkan cawan-cawan petri yang berisi medium agar steril. Beri label.
- c. Pijarkan ujung ose lalu dinginkan. Ambil 1 ose biakan kemudian goreskan pada permukaan agar cawan yang baru. Gunakan metode goresan T, goresan kuadran atau goresan radian.
- d. Bungkus dengan kertas dan inkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24-48 jam.

2. Dari agar cawan ke agar miring
 - a. Siapkan cawan petri berisi biakan hasil isolasi. Pilih koloni-koloni yang akan dipindahkan.
 - b. Siapkan medium agar miring dal tabung reaksi steril.
 - c. Pijarkan ujung ose lalu dinginkan. Buka tutup cawan petri di depan lampu bunsen dan ambil 1 ose biakan. Pegang sekitar api, jaga jangan sampai tercemar mikroba dari benda lain maupun udara dan jangan sampai terbakar.
 - d. Ambil tabung reaksi, buka kapas penutup tabung dan panaskan leher tabung. Goreskan ose pada agar miring dengan pola kelak-kelok atau lurus dimulai dari dasar tabung.
 - e. Beri label, bungkus dengan kertas dan inkubasi dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24-48 jam.

Acara Praktikum: Pengamatan Bentuk Morfologi Bakteri hasil Isolasi

Cara kerja:

1. Buat preparat ulas dari koloni bakteri hasil isolasi yang sudah murni.
2. Beri sedikit pewarna safranin selama 30 detik.
3. Cuci dengan air mengalir dan keringkan.
4. Amati bentuk morfologi bakteri dan gambarkan.

IV. Jurnal Praktikum

Acara Praktikum III :

Judul :

Tujuan :

Hipotesis :

a. Alat dan bahan

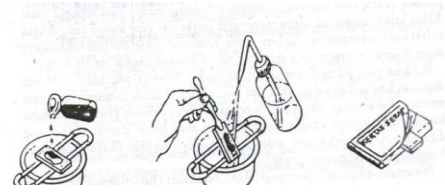
b. Cara kerja

d. Analysis

V. Pertanyaan Diskusi

1. Apakah metode sterilisasi yang Anda gunakan sudah efektif?
2. Menurut Anda, tahapan apa yang paling sulit ketika isolasi? Jelaskan

Praktikum 4	MIKROSKOPI, MORFOLOGI MIKROBA DAN PEWARNAAN
----------------	--



I. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum, mahasiswa dapat:

1. menggunakan mikroskop dengan benar, termasuk menentukan perbesaran, ukuran dan jumlah sel mikroba.
2. Membedakan morfologi mikroba
3. membuat preparat bakteri yang diberi pewarnaan sederhana dan Gram.
4. membedakan Gram positif dan Gram negatif

II. Pendahuluan

Identifikasi mikroba adalah salah satu tugas yang lazim dilakukan di laboratorium mikrobiologi. Namun mikroba tidak dapat diamati ciri anatominya secara nyata dengan mikroskop cahaya, karena tidak dapat mengabsorpsi maupun membiaskan cahaya. Sehingga untuk mengamatnya diperlukan pewarnaan. Zat warna mengabsorpsi dan ataupun membiaskan cahaya sehingga kontras mikroorganisme dengan sekelilingnya dapat ditingkatkan.

Pewarnaan yang digunakan untuk melihat salah satu struktur sel disebut pewarnaan khusus, contohnya pewarnaan flagel dan pewarnaan endospora. Pewarnaan yang digunakan untuk memilah-milah mikroorganisme disebut pewarnaan diferensial, contohnya pewarnaan Gram yang memisahkan bakteri menjadi kelompok Gram-positif dan Gram negatif, dan pewarnaan Ziehl-Neelsen yang memisahkan bakteri menjadi kelompok tahan asam (dari genus *Mycobacterium* dan *Nocardia*) dan tidak tahan asam.

Pewarnaan sederhana hanya menggunakan satu macam zat warna saja. Prosedur pewarnaan ini mudah dan cepat, sehingga pewarnaan ini sering digunakan untuk melihat bentuk, ukuran dan penataan bakteri.

Pewarnaan Gram atau metode Gram adalah suatu metode empiris untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, Gram-positif dan Gram-negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel mereka. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884 untuk membedakan antara pneumokokus dan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Bakteri gram-positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna metil ungu sewaktu proses pewarnaan Gram. Bakteri jenis ini akan berwarna biru atau ungu di bawah mikroskop, sedangkan bakteri gram-negatif akan berwarna merah atau merah muda. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri. Banyak spesies bakteri gram-negatif yang bersifat patogen, yang berarti mereka berbahaya bagi organisme inang. Sifat patogen ini umumnya berkaitan dengan komponen tertentu pada dinding sel gram-negatif, terutama lapisan *lipopolisakarida* (dikenal juga dengan LPS atau endotoksin).

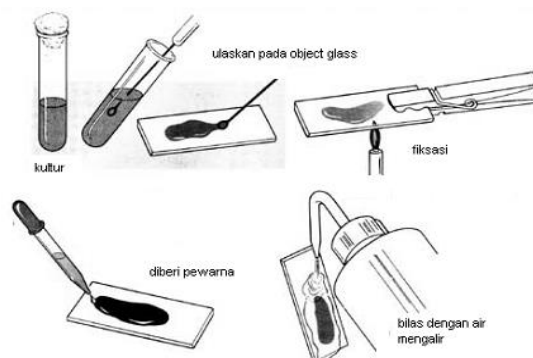
Karakteristik utama dinding sel bakteri Gram positif adalah tebalnya lapisan peptidoglikan pada dinding sel. Akibatnya, pada saat prosedur pewarnaan Gram, meninggalkan warna biru. Dinding sel Gram positif biasa ditemukan pada Actinobacteria dan Firmicutes. Tidak seperti dinding sel Gram positif, dinding sel Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis. Hal ini menyebabkan lunturnya warna biru saat disiram etanol.

III. Metode

Acara Praktikum: Teknik Pewarnaan Sederhana Bakteri

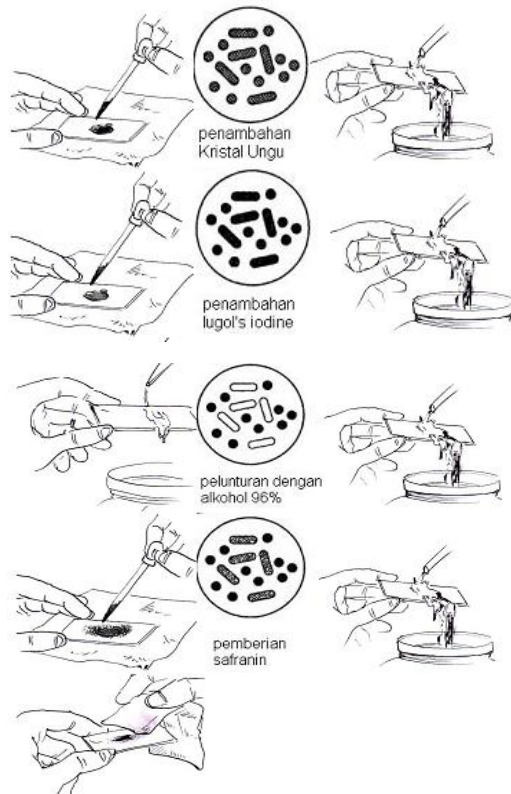
Sebelum dilakukan pewarnaan, terlebih dahulu harus dibuat preparat ulas. Berikut ini cara membuat preparat ulas:

- Untuk biakan cair,
 1. Bersihkan kaca obyek dengan kapas yang dibasahi alkohol.
 2. Beri label pada sudut kaca.
 3. Kocok tabung berisi suspensi bakteri kemudian ambil 2 mata ose suspensi dan ulaskan di bagian tengah kaca obyek.
 4. Biarkan mengering di udara sebentar.
 5. Fiksasi di atas api untuk membunuh dan melekatkan mikroba pada kaca obyek.
- Untuk biakan padat,
 1. Bersihkan kaca obyek dengan kapas yang dibasahi alkohol.
 2. Beri label pada sudut kaca.
 3. Teteskan 2 mata ose garam fisiologis atau akuades steril di atas kaca obyek.
 4. Lalu ambil satu ose biakan bakteri dari koloni di atas medium padat, campurkan dengan garam fisiologis/akuades steril secara merata. Ulaskan campuran ini di atas kaca obyek.
 5. Keringkan di udara sebentar.
 6. Fiksasi di atas api.
- Untuk pewarnaan sederhana
 1. Buat preparat ulas.
 2. Beri larutan zat warna, dapat menggunakan larutan biru metilen atau larutan karbol fukhsin basa ataupun safranin.
 3. Biarkan zat warna selama 30 detik.
 4. Cuci dan keringkan dengan hati-hati menggunakan kertas saring atau tisu.
 5. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x. Bila menggunakan pewarna biru metilen mikroba akan tampak berwarna biru, dan bila menggunakan pewarna karbol fukhsin basa atau safranin akan tampak berwarna merah.
 6. Laporkan hasil pengamatan.



Acara Praktikum: Pewarnaan Gram

1. Buat preparat ulas
2. Beri larutan kristal violet selama 1 menit.
3. Cuci dengan air mengalir.
4. Beri larutan lugol selama 1 menit
5. Beri larutan pemucat (aseton alkohol) selama 10-20 detik. Perhatikan waktu pemucatan karena jika terlalu lama akan memberikan hasil yang menyimpang.
6. Cuci dengan air mengalir.
7. Beri larutan safranin selama 15 detik.
8. Cuci dengan air mengalir, kemudian keringkan dengan kertas saring atau tisu.
9. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x.
10. Laporkan hasil pengamatan.



Acara Praktikum: Pewarnaan Tahan Asam (Ziehl-Neelsen)

1. Buat preparat ulas.
2. Tutup preparat ulas dengan selembar kertas saring, kemudian tambahkan larutan pewarna karbol fuchsin (dalam fenol 5%). Panaskan dia atas lampu bunsen selama 5 menit sehingga terlihat uap. Jangan biarkan preparat mengering.
3. Setelah preparat mengering, buang kertas saring, kemudian cuci dengan air mengalir.
4. Cuci dengan asam alkohol selama 20 detik.
5. Cuci dengan air untuk menghentikan pemucatan.
6. Warnai dengan biru metilin selama 1 menit.
7. Cuci dengan air mengalir.
8. Keringkan dengan kertas saring/tisu.
9. Amati dengan mikroskop perbesaran 100 x. Bila bakteri tahan asam akan berwarna merah, bila bukan akan berwarna biru.
10. Laporkan hasil pengamatan.

Acara Praktikum: Pewarnaan Endospora (Schaeffer-Fulton)

1. Buat preparat ulas dari biakan tua bakteri (72 jam).
2. Tempatkan preparat ulas pada rak pewarnaan. Tutup dengan selembar kertas saring, kemudian tambahkan larutan hijau malakit.
3. Panaskan preparat selama 5 menit sehingga terlihat uap. Jangan biarkan preparat mengering. Kertas saring menghindari penguapan yang tidak merata dan menjaga agar sediaan tidak kering. Panas mengembangkan lapisan luar spora, sehingga zat warna hijau malakit dapat masuk ke dalam spora. Setelah dingin warna hijau ini terperangkap di dalam spora.

4. Dinginkan selama 1 menit. Buang kertas saring kemudian cuci dengan air. Air akan mencuci zat warna malakit hijau dari sel vegetatif, namun tidak dapat mencucinya dari spora.
5. Beri zat warna safranin selama 1 menit lalu cuci dengan air mengalir. Keringkan dengan hati-hati menggunakan kertas saring/tisu.
6. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x.
7. Laporkan hasil pengamatan.

IV. Jurnal Praktikum

Acara Praktikum :
Judul :
Tujuan :
Hipotesis :

a. Alat dan bahan

b. Cara kerja

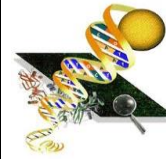
D. Analisis

V. Pertanyaan Diskusi

1. Apakah hasil pewarnaan sesuai dengan teori mengenai bakteri tersebut? Jelaskan

Praktikum 5
ABILA
1

DAYA KERJA ANTIMIKROBA DAN
OLIGODINAMIK



Pendahuluan

Apa yang harus dilakukan ketika salah satu bagian tubuhmu mengalami luka? Kebanyakan dari kita akan memberikan obat luka atau kita sebut antiseptik. Antiseptik mengandung bahan yang dapat membunuh mikroba atau antimikroba, misalnya *povidone iodine*. Bahan antimikroba untuk tubuh yang digunakan untuk tubuh banyak jenisnya, mulai dari bahan kimia yang mengandung halogen, seperti *iodine* tadi, aldehid, fenol, alkohol, deterjen, hingga logam berat dan antibiotik. Di samping itu, ada juga beberapa bagian tanaman yang mengandung bahan antimikroba, yang kita sebut fitofarmaka atau antimikroba bahan alami. Luka tidak akan sembuh jika menjadi tempat berkembang biak mikroba, maka mikroba yang ada di sekitar luka perlu diberantas. Oleh sebab itu, obat luka mengandung bahan antimikroba.

Bahan antimikroba tidak hanya digunakan dalam penyembuhan luka, tetapi digunakan juga untuk membunuh mikroba yang ada pada benda-benda yang ada di sekitar kita. Zat kimia yang digunakan untuk keperluan ini disebut disinfektans. Ketika kita menggunakan alat-alat dan benda lain dalam praktikum mikrobiologi atau bidang kesehatan, diperlukan aplikasi disinfektans untuk meminimalisir kontaminasi mikroba.

Untuk menguji efektivitas kerja bahan antimikroba, dapat digunakan berbagai metode. Salah satunya adalah dengan metode difusi kertas cakram pada media agar atau yang disebut metode Kirby-Bauer. Sensitivitas bakteri uji terhadap bahan antimikroba yang diujikan ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Bakteri yang digunakan dapat berasal dari kelompok Gram negatif, seperti *Escherichia coli*, atau Gram positif, seperti *Staphylococcus aureus* atau *Bacillus* sp.

Pertanyaan pengarah:

- ✓ Carilah informasi tentang jenis-jenis bahan antimikroba dan daya kerjanya. Apa perbedaan antiseptik, disinfektans, antibiotik dan daya oligodinamik?
- ✓ Apakah semua jenis mikroba dapat dibunuh oleh suatu jenis zat antimikroba?
- ✓ Apa yang membedakan aktivitas suatu zat antimikroba terhadap suatu jenis mikroba?
- ✓ Apa perbedaan cara kerja golongan halogen, aldehid, fenol, alkohol, logam berat, agen surfaktans dan fitofarmaka?
- ✓ Bagaimana pengaruh senyawa asam, basa, dan larutan garam terhadap mikroba?
- ✓ Faktor apa saja yang dapat mempengaruhi aktivitas zat antimikroba?

Tugasmu

Desain dan laksanakan sebuah eksperimen untuk menentukan jenis antimikroba yang paling efektif dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji.

Tentukan jenis-jenis zat antimikroba, dari jenis antiseptik, desinfektans, antibiotik, antimikroba bahan alami, atau logam berat, untuk diuji konsentrasi yang memiliki aktivitas paling efektif dalam membunuh atau menghambat suatu jenis bakteri dari kelompok Gram positif dan Gram negatif dengan menggunakan metode agar difusi.

Uraian jawaban pertanyaan pengarah

Pertanyaan penyelidikan:

Antimikroba golongan manakah yang paling efektif terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*)? Mengapa?

Material

Material berikut mungkin dibutuhkan dalam penyelidikan ini:

- Media nutrient agar dalam cawan petri
- Kertas cakram
- Bahan antimikroba yang diujikan
- Kultur *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*
- Kertas label dan spidol
- Inkubator
- Pinset
- Bunsen dan ose atau jarum inokulum

Untuk keamanan:

1. Cuci tangan dengan sabun sebelum dan sesudah bekerja secara aseptik pada percobaan.
2. Selalu gunakan sarung tangan karet dan masker selama bekerja dengan bakteri.
3. Semprot tangan praktikan dan meja kerja sebelum bekerja dengan media dan mikroba, untuk menghindari kontaminasi yang dapat mengakibatkan kaburnya data.
4. Ikuti semua peraturan keamanan laboratorium.

Mulai

Tahap pertama untuk melaksanakan percobaan ini adalah, pilih empat jenis bahan antimikroba yang akan diujikan. Kemudian tentukan desain dan pelaksanaan percobaan untuk menentukan golongan zat antimikroba yang paling efektif terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Untuk menentukan data yang harus dikumpulkan, perhatikan pertanyaan-pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi variabel bebasnya? Dan apa yang menjadi variabel terikatnya?
- ✓ Jenis pengukuran apa saja yang perlu dilakukan selama penyelidikan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dikumpulkan, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi kondisi pembanding/kontrol dalam percobaan ini?
- ✓ Jenis kondisi perlakuan apa yang perlu diatur dan bagaimana melakukannya?
- ✓ Berapa banyak tabung reaksi, cawan petri dan media yang dibutuhkan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dianalisis, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Bagaimana menentukan efektivitas bahan antimikroba yang diujikan?
- ✓ Bagaimana pengukuran yang harus dilakukan?
- ✓ Bagaimana data ditabulasikan dan dianalisis? Siapkan sebelum saatnya pengamatan
- ✓ Apakah perlu dibuat grafik untuk membantu menganalisis data?

Hipotesis

- ✓ Sebelum merancang dan melaksanakan percobaan, diskusikan pertanyaan penyelidikan dengan anggota kelompokmu menurut pengetahuan dan pengalamanmu sehari-hari.
- ✓ Catat hasil diskusi kelompokmu dalam bentuk argumen pada kolom di bawah ini:

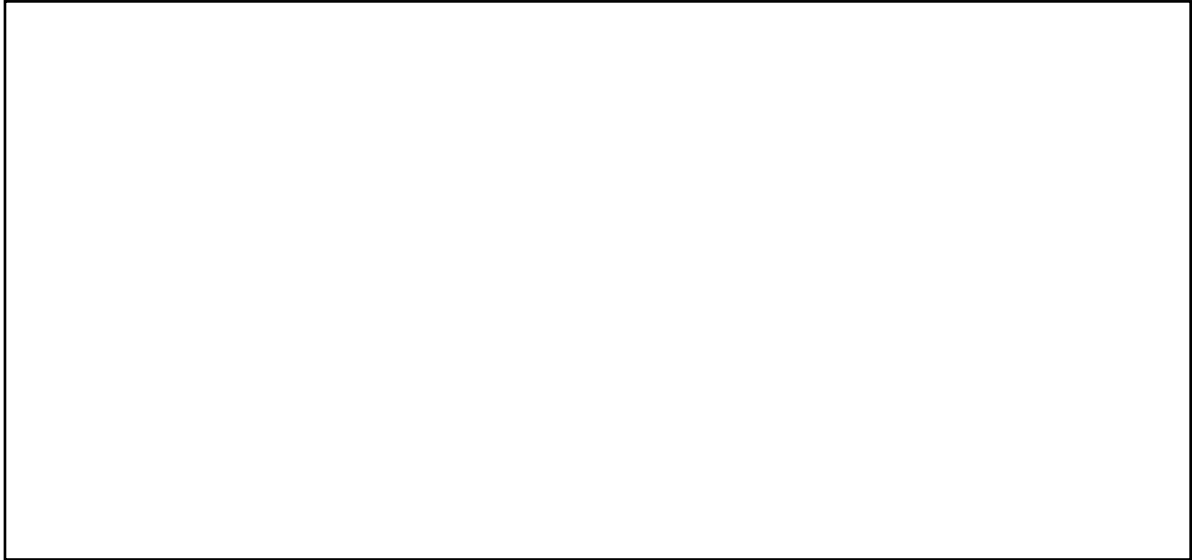
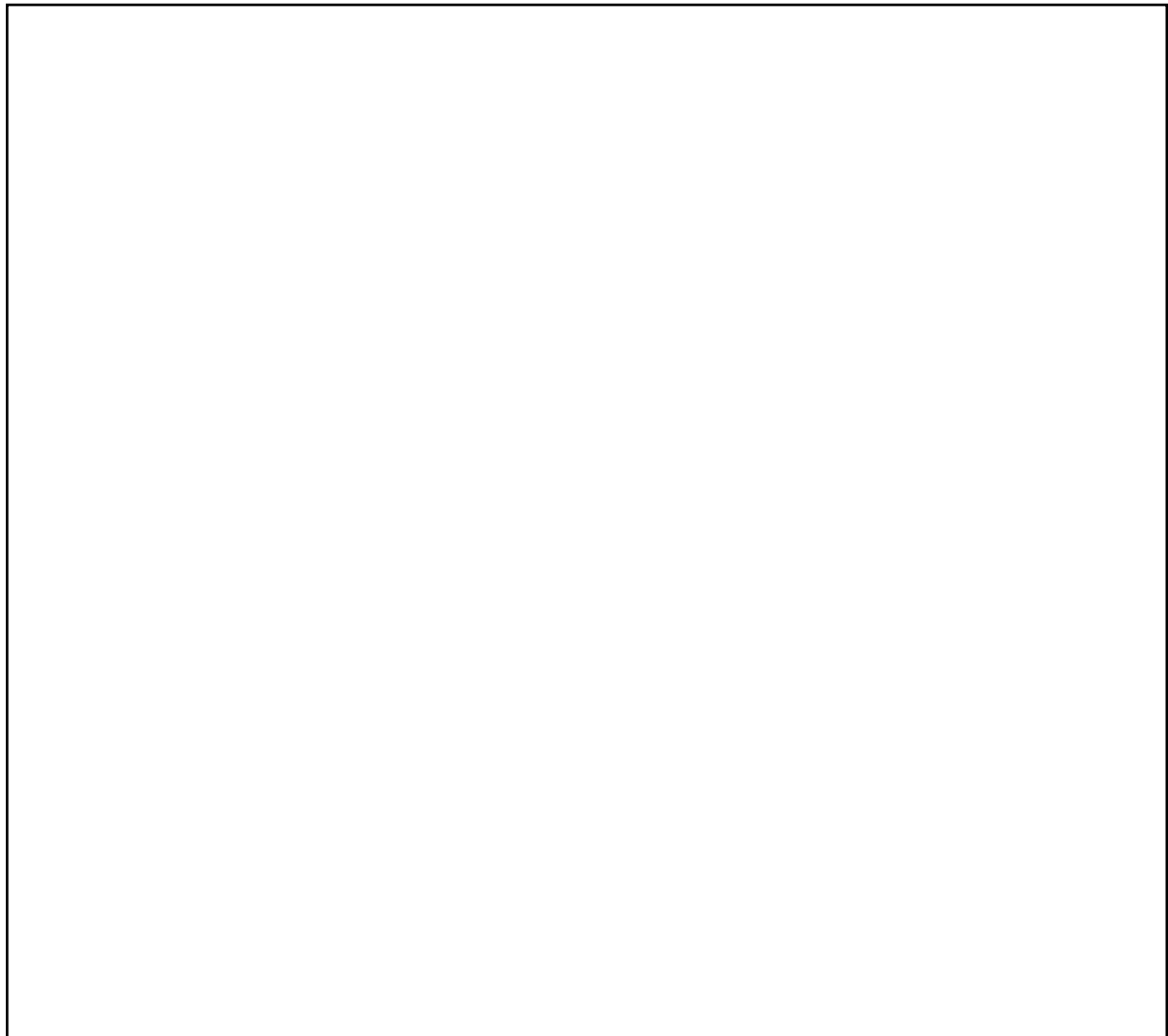
Argumen

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

- ✓ Tuliskan juga hipotesis penyelidikan kelompokmu

Percobaan

Susunlah rancangan dan laksanakan percobaan untuk membuktikan hipotesis kelompok Anda.

Alat dan bahan yang digunakan**Metode/ cara kerja (dalam bentuk bagan/gambar)**

Perumusan Argumen

Buatlah inferensi dari data hasil percobaan dan penjelasan mengapa hasil penyelidikan demikian, yang digunakan untuk merumuskan argumen kelompok Anda berkaitan dengan pertanyaan penyelidikan yang diajukan.

Argumen:

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

Argumentasi Kelas

- ✓ Setiap perwakilan kelompok mempresentasikan argumen hasil kelompoknya dalam kelompok kecil yang dibentuk oleh perwakilan dari tiap kelompok, dan mencatat setiap saran, masukan, dari kelompok lain, baik itu setuju ataupun tidak dengan argumen kelompok Anda
- ✓ Kelompok lain mengkritisi argumen kelompok yang presentasi yang meliputi mengkritisi **argumen, kesimpulan, penjelasan, metode yang digunakan dan dasar teori yang disampaikan**. Sementara dalam argumennya, perlu **dikritisi isi klaimnya, kualitas bukti yang disertakan untuk mendukung klaim dan kekuatan rasional dari penjelasan bukti** yang disertakan.
- ✓ Perlu diingat, tujuan dari sesi argumentasi ini **bukanlah** untuk meyakinkan kelompok lain bahwa argumen kelompok Anda paling baik, melainkan untuk mengidentifikasi kesalahan atau kekeliruan dalam membuat rasional dan penjelasan argumennya, sehingga dapat diperbaiki.
- ✓ Catatlah setiap masukan dan kritik dari kelompok lain sebagai bahan pertimbangan dalam memperbaiki argumen untuk laporan tertulis.
- ✓ Setelah selesai sesi argumentasi, Anda dapat kembali kepada kelompok Anda dan mendiskusikan masukan dari kelompok lain untuk merivisi argumen yang disusun. Kelompok Anda mungkin perlu mengumpulkan lebih banyak data untuk memperbaikinya.

Laporan Tertulis

- ✓ Buatlah laporan tertulis hasil penyelidikan sebanyak 4 rangkap yang mencakup:
 - Pertanyaan apa yang coba dijawab dan mengapa?
 - Apa yang dilakukan selama penyelidikan untuk menjawab pertanyaan penyelidikan dan mengapa penyelidikan dilakukan dengan cara seperti yang dilakukan?
 - Apa argumenmu?
- ✓ Laporan harus mampu menjawab pertanyaan ini dengan jelas, dengan disertai gambar, tabel, diagram atau grafik yang relevan.
- ✓ Pastikan laporan ditulis dengan **gaya persuasif**, Anda mencoba untuk meyakinkan yang lain bahwa klaimmu dapat diterima dan valid.
- ✓ Kumpulkan laporan 2 hari setelah pengamatan hasil percobaan dan sesi diskusi.

Peer-Review

- ✓ Anda akan menerima laporan mahasiswa lain dengan kode tanpa identitas, untuk Anda review dengan mengacu pada panduan penilaian peer review yang Anda peroleh.
- ✓ Hasil review diserahkan kembali kepada instruktur setelah selesai dan tidak diperkenankan dibawa pulang.

Revisi dan Evaluasi

- ✓ Anda akan menerima kembali laporan penyelidikan Anda yang telah direview oleh teman Anda untuk direvisi sesuai masukan dari reviewer.
- ✓ Kumpulkan hasil revisi kepada instruktur 2 hari setelah Anda terima untuk dievaluasi oleh instruktur.



Pendahuluan

Susu cair dapat tahan berbulan-bulan dalam kemasan kedap udara. Namun ketika kemasannya dibuka, dalam waktu beberapa jam saja susu itu menjadi rusak atau basi. Mengapa hal ini dapat terjadi?

Mikroorganisme terdapat dimana-mana dan menempati habitat yang beragam. Mereka terdapat di tanah, air dan atmosfer planet kita, termasuk di sekitar manusia terutama di mana terdapat sumber nutrisi bagi mereka. Mikroorganisme juga terdapat pada permukaan benda yang kita gunakan dan bahkan pada tubuh kita seperti di permukaan kulit. Pada saat bersin, kita dapat melontarkan beribu-ribu mikroorganisme. Satu gram tinja dapat mengandung jutaan bakteri (Pelczar, 1988).

Mikroorganisme berada di habitatnya dalam populasi campuran yang kompleks. Isolasi berarti proses memisahkan mikroorganisme dari sumber atau habitat aslinya dan menumbuhkannya pada media pertumbuhan mikroba. Kegiatan isolasi mikroba ini bertujuan untuk mengisolasi/memisahkan mikroba dari habitatnya dan untuk mengetahui jenis kelompok mikroba yang menempati suatu sumber dan untuk mempelajari sifat dan karakteristiknya. Populasi mikroba di sekitar kita sangat besar dan kompleks. Untuk mempelajari keberadaan mikroba di sekitar kita, dapat dilakukan pemisahan antara satu dengan lainnya atau yang kita kenal dengan isolasi.

Mikroba merupakan organisme yang tersebar di berbagai habitat, termasuk di sekitar kita. Di antara jenis mikroorganisme, bakteri merupakan mikroorganisme yang paling sederhana. Namun, bakteri merupakan mikroba paling beragam dan tersebar luas di permukaan bumi, mulai dari lingkungan kita, hingga lingkungan paling ekstrem seperti sumber air panas bahkan di antartika. Bahkan di tempat-tempat yang tidak kita duga, seperti di permukaan tempat tidur kita atau di permukaan telepon genggam, mikroba dapat tumbuh dan menyebar dengan baik.

Pertanyaan pengarah:

- ✓ Amatilah lingkungan di sekitarmu. Apakah menurutmu, udara di dalam ruangan dan di luar ruangan memiliki jumlah dan jenis mikroba yang sama? Mengapa?
- ✓ Faktor apakah yang menentukan jumlah dan keragaman mikroba di suatu tempat?
- ✓ Apakah mungkin secara tidak sadar kita menyebarkan mikroba dari satu tempat ke tempat lain dan menyediakan kebutuhan mikroba, sehingga mereka dapat tumbuh dan berkembang secara leluasa di sekitar kita? Kebutuhan apa sajakah itu? Dalam bentuk apa?
- ✓ Ingatlah kembali berbagai teknik isolasi pada acara praktikum sebelumnya. Uraikan teknik isolasi dari sampel yang berbentuk cairan, padatan, udara maupun permukaan suatu benda atau makhluk hidup.

Tugasmu

Desain dan laksanakan sebuah percobaan untuk menentukan penjelasan bagaimana kondisi lingkungan di suatu tempat, misalnya di dalam dan di luar ruangan, di dalam ruangan dengan sedikit dan banyak orang; di sebuah permukaan benda yang dibersihkan dan tidak, dapat menentukan jumlah dan jenis mikroba yang berada di tempat itu.

Uraian jawaban pertanyaan pengarah

Pertanyaan Penyelidikan:

Bagaimana kondisi lingkungan menentukan jumlah dan keragaman bakteri dari suatu sumber?

Material

Material berikut mungkin dibutuhkan dalam penyelidikan ini:

- Media nutrient agar dalam cawan petri
- Kapas bertangkai atau *cotton buds*
- Alkohol 70% atau desinfektans lain
- Sabun antiseptik
- Kertas label dan spidol
- Inkubator
- Bunsen

Untuk keamanan:

1. Cuci tangan dengan sabun sebelum dan sesudah bekerja secara aseptik pada percobaan.
2. Selalu gunakan sarung tangan karet dan masker selama bekerja dengan bakteri.
3. Ikuti semua peraturan keamanan laboratorium.

Mulai

Tahap pertama untuk melaksanakan percobaan ini adalah menentukan sumber untuk mengisolasi bakteri, baik itu udara atau benda, kemudian catat kondisi lingkungan yang memungkinkan Anda membuat perbandingan yang mungkin mempengaruhi jumlah dan jenis mikroba yang terdapat padanya. Kemudian rancanglah serangkaian percobaan untuk mengetahui jenis mikroba yang dapat diisolasi dari suatu tempat dan dibandingkan dengan dari tempat lain yang memiliki kondisi yang berbeda, sehingga dapat ditentukan apa yang menyebabkannya berbeda.

Untuk menentukan data yang harus dikumpulkan, perhatikan pertanyaan-pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi variabel bebasnya? Dan apa yang menjadi variabel terikatnya?
- ✓ Jenis pengukuran apa saja yang perlu dilakukan selama penyelidikan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dikumpulkan, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi kondisi pembanding/kontrol dalam percobaan ini?
- ✓ Jenis kondisi perlakuan apa yang perlu diatur dan bagaimana melakukannya?
- ✓ Berapa cawan petri dan media yang dibutuhkan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dianalisis, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Bagaimana menentukan jumlah dan jenis mikroba yang berhasil diisolasi?
- ✓ Pengukuran apa saja yang harus dilakukan?
- ✓ Bagaimana data yang diperoleh ditabulasikan? Siapkan sebelum kegiatan pengamatan.
- ✓ Apakah perlu dibuat tabel, diagram, atau grafik untuk membantu menganalisis data?

Hipotesis

- ✓ Sebelum merancang dan melaksanakan percobaan, diskusikan pertanyaan penyelidikan di atas dengan anggota kelompokmu.
- ✓ Catat hasil diskusi kelompokmu dalam bentuk argumen pada kolom di bawah ini:

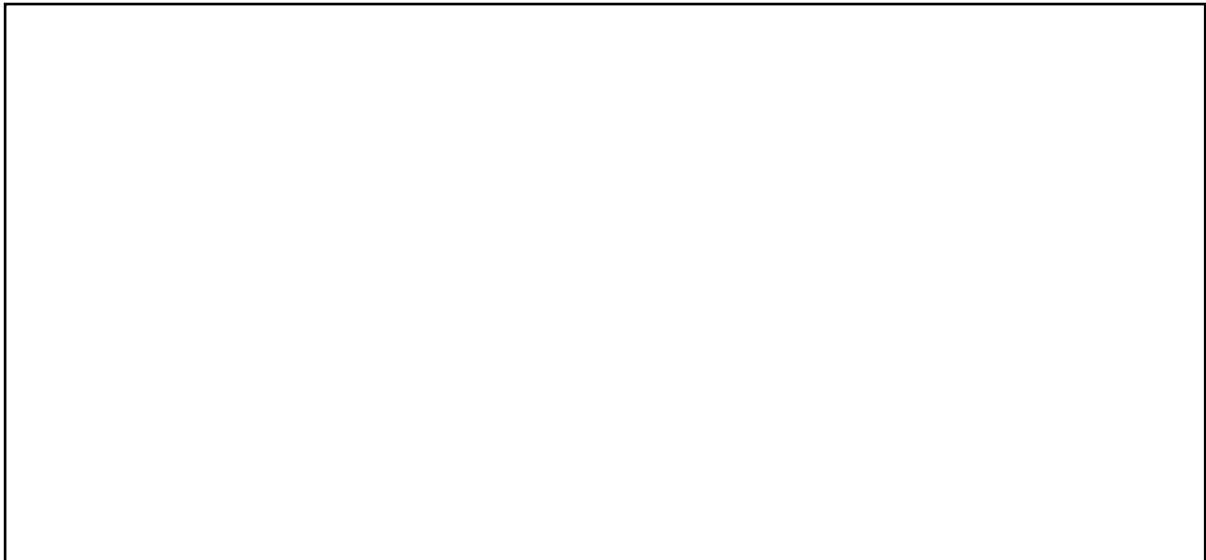
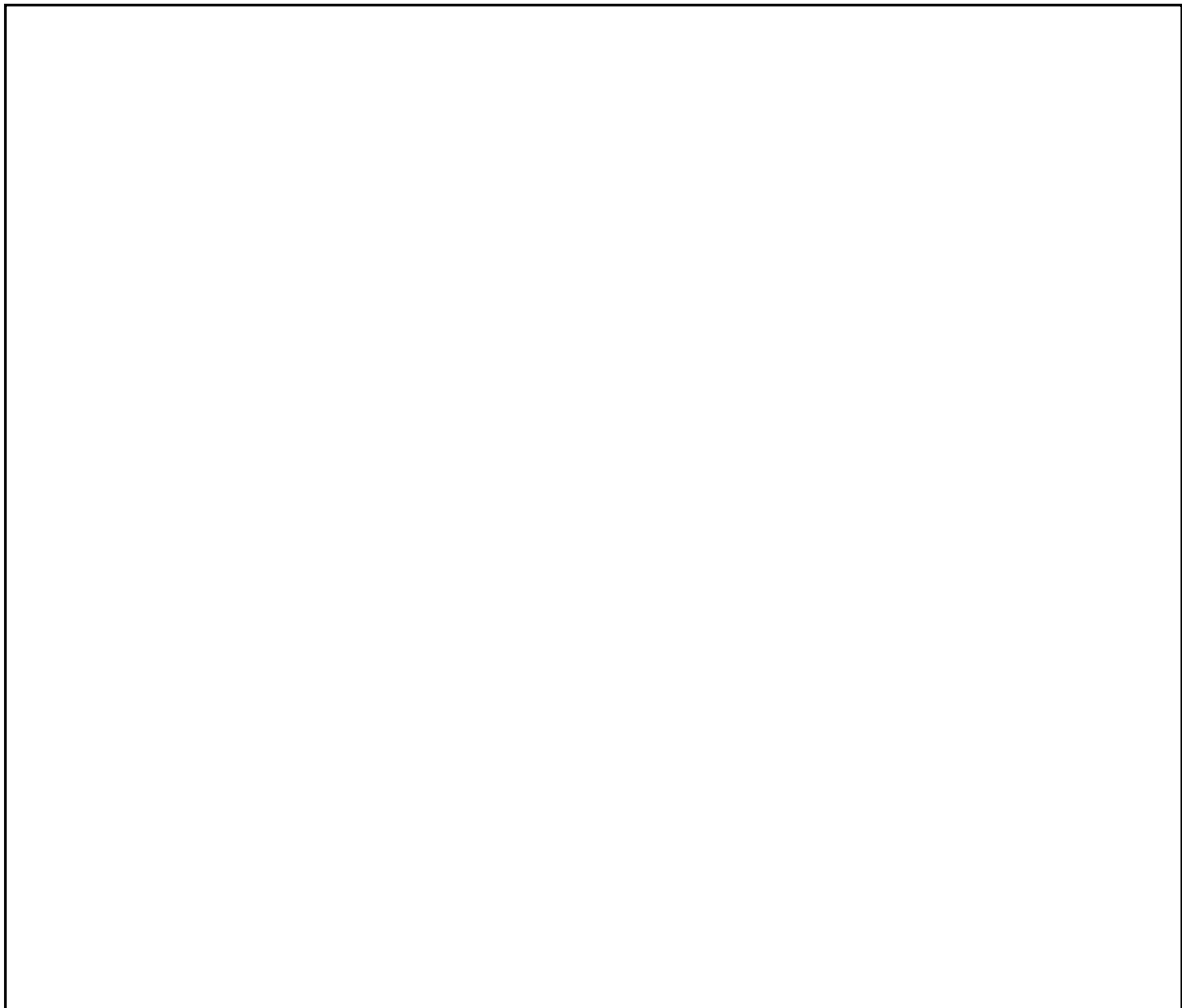
Argumen

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

- ✓ Tuliskan juga hipotesis penyelidikan kelompokmu

Percobaan

Susunlah rancangan dan laksanakan percobaan untuk membuktikan hipotesis kelompok Anda.

Alat dan bahan yang digunakan**Metode/ cara kerja (dalam bentuk bagan/gambar)**

This image shows a completely blank white page. It is surrounded by a thin black rectangular border, which appears to be the edge of a scanned document or a frame. There are no markings, text, or illustrations on the page itself.

Perumusan Argumen

Buatlah inferensi dari data hasil percobaan dan penjelasan mengapa hasil penyelidikan demikian, yang digunakan untuk merumuskan argumen kelompok Anda berkaitan dengan pertanyaan penyelidikan yang diajukan.

Argumen:

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

Argumentasi Kelas

- ✓ Setiap perwakilan kelompok mempresentasikan argumen hasil kelompoknya dalam kelompok kecil yang dibentuk oleh perwakilan dari tiap kelompok, dan mencatat setiap saran, masukan, dari kelompok lain, baik itu setuju ataupun tidak dengan argumen kelompok Anda
- ✓ Kelompok lain mengkritisi argumen kelompok yang presentasi yang meliputi mengkritisi argumen, kesimpulan, penjelasan, metode yang digunakan dan dasar teori yang disampaikan. Sementara dalam argumennya, perlu dikritisi isi klaimnya, kualitas bukti yang disertakan untuk mendukung klaim dan kekuatan rasional dari penjelasan bukti yang disertakan.
- ✓ Perlu diingat, tujuan dari sesi argumentasi ini bukanlah untuk meyakinkan kelompok lain bahwa argumen kelompok Anda paling baik, melainkan untuk mengidentifikasi kesalahan atau kekeliruan dalam membuat rasional dan penjelasan argumennya, sehingga dapat diperbaiki.
- ✓ Catatlah setiap masukan dan kritik dari kelompok lain sebagai bahan pertimbangan dalam memperbaiki argumen untuk laporan tertulis.
- ✓ Setelah selesai sesi argumentasi, Anda dapat kembali kepada kelompok Anda dan mendiskusikan masukan dari kelompok lain untuk merivisi argumen yang disusun. Kelompok Anda mungkin perlu mengumpulkan lebih banyak data untuk memperbaikinya.

Laporan Tertulis

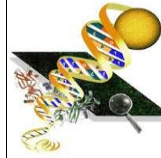
- ✓ Buatlah laporan tertulis hasil penyelidikan sebanyak 4 rangkap yang mencakup:
 - Pertanyaan apa yang coba dijawab dan mengapa?
 - Apa yang dilakukan selama penyelidikan untuk menjawab pertanyaan penyelidikan dan mengapa penyelidikan dilakukan dengan cara seperti yang dilakukan?
 - Apa argumenmu?
- ✓ Laporan harus mampu menjawab pertanyaan ini dengan jelas, dengan disertai gambar, tabel, diagram atau grafik yang relevan.
- ✓ Pastikan laporan ditulis dengan gaya persuasif, Anda mencoba untuk meyakinkan yang lain bahwa klaimmu dapat diterima dan valid.
- ✓ Kumpulkan laporan 2 hari setelah pengamatan hasil percobaan dan sesi diskusi.

Peer-Review

- ✓ Anda akan menerima laporan mahasiswa lain dengan kode tanpa identitas, untuk Anda review dengan mengacu pada panduan penilaian peer review yang Anda peroleh.
- ✓ Hasil review diserahkan kembali kepada instruktur setelah selesai dan tidak diperkenankan dibawa pulang.

Revisi dan Evaluasi

- ✓ Anda akan menerima kembali laporan penyelidikan Anda yang telah direview oleh teman Anda untuk direvisi sesuai masukan dari reviewer.
- ✓ Kumpulkan hasil revisi kepada instruktur 2 hari setelah Anda terima untuk dievaluasi oleh instruktur.



Pendahuluan

Tempe merupakan makanan yang mungkin sering kita konsumsi sehari-hari. Tempe adalah makanan yang dibuat dari kacang kedelai yang difermentasikan. Fermentasi tempe menggunakan kapang *Rhizopus oligosporus* ("ragi tempe"). Tempe kaya akan serat, kalsium, vitamin B dan zat besi. Tempe banyak dikonsumsi di Indonesia, tetapi sekarang telah mendunia. Kaum vegetarian telah menganggap tempe sebagai pengganti daging.

Yoghurt atau yogurt, adalah susu yang dibuat melalui fermentasi bakteri. Yoghurt dapat dibuat dari susu apa saja, susu kambing, susu sapi, termasuk susu kacang kedelai. Tetapi produksi modern saat ini didominasi susu sapi. Di dalam yoghurt terdapat perubahan laktosa (gula susu) menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat yang menghasilkan tekstur dan aroma yang khas. Karena asam ini lah yang menyebabkan protein dalam susu menjadi padat. Bakteri yang digunakan dalam fermentasi yoghurt diantaranya *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*.

Fermentasi merupakan proses terjadinya penguraian senyawa-senyawa organik untuk menghasilkan energi yang disertai terjadinya perubahan substrat menjadi produk baru oleh mikroba (Madigan, 2011). Dalam bidang pangan, fermentasi diartikan sebagai pengubahan suatu bahan pangan menjadi bentuk dan nilai gizi yang berbeda dengan bantuan mikroorganisme. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses terjadinya fermentasi diantaranya jenis substrat dan inokulum yang digunakan, pH atau keasaman, suhu dan waktu yang digunakan untuk inkubasi. Faktor-faktor ini, bergantung pada jenis mikroba yang digunakan dalam fermentasi, menentukan keberhasilan fermentasi dengan membuat kondisi yang paling menguntungkan untuk pertumbuhan mikroba yang digunakan.

Pertanyaan pengarah:

- ✓ Perubahan apa yang terjadi pada proses pembuatan tempe dan yoghurt? Mikroba apa yang berperan dalam proses ini?
- ✓ Faktor apa yang paling mungkin dikondisikan dalam menghasilkan tempe dan yoghurt yang baik?
- ✓ Mengapa bahan dan alat yang digunakan dalam pembuatan tempe maupun yoghurt harus selalu dalam keadaan bersih, bahkan steril?
- ✓ Bagaimana menentukan kualitas tempe dan yoghurt yang baik? Apakah berdasarkan bentuk, tekstur, warna, pH, rasa atau aroma? Carilah informasi mengenai hal ini sebanyak-banyaknya,

Tugasmu

Desain dan laksanakan sebuah eksperimen untuk menentukan faktor yang paling optimum dalam proses fermentasi tempe dan yoghurt. Rancanglah serangkaian percobaan berbagai jenis substrat, konsentrasi inokulum dan kondisi suhu yang berbeda dalam melakukan fermentasi tempe dan yoghurt, sehingga dapat ditentukan kondisi mana yang paling optimal dan menghasilkan produk fermentasi yang terbaik.

Uraian jawaban pertanyaan pengarah

Pertanyaan penyelidikan

Bagaimana pengaruh faktor lingkungan terhadap kualitas produk fermentasi tempe dan yoghurt?

Material

Material berikut mungkin dibutuhkan dalam penyelidikan ini:

- Kacang kedelai, dan substrat lain serta ragi untuk membuat tempe
- Susu sapi, dan susu lain serta starter/inokulum untuk membuat yoghurt
- Kompor
- Panci
- Daun/plastik
- Stoples
- Baskom dan baki
- Termometer
- Inkubator pada berbagai kondisi suhu

Untuk keamanan:

1. Cuci tangan dengan sabun sebelum dan sesudah bekerja secara aseptik pada percobaan.
2. Selalu gunakan sarung tangan karet dan masker selama bekerja.
3. Ikuti semua peraturan keamanan laboratorium.

Mulai

Tahap pertama untuk melaksanakan percobaan ini adalah menentukan faktor lingkungan apa yang akan dijadikan perlakuan, misalnya jenis substrat, konsentrasi inokulum atau suhu fermentasi. Dengan memperhatikan kondisi optimum dari faktor lingkungan ini, rancanglah dan laksanakan serangkaian eksperimen untuk menentukan faktor lingkungan yang paling optimal dalam fermentasi, sedemikian rupa sehingga memungkinkan dibuat perbandingan. Tentukan juga kondisi yang bagaimana bahwa fermentasi berjalan optimal, misalnya produk fermentasi yang dihasilkan akan seperti apa.

Untuk menentukan data yang harus dikumpulkan, perhatikan pertanyaan-pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi variabel bebasnya? Dan apa yang menjadi variabel terikatnya?
- ✓ Jenis pengukuran apa saja yang perlu dilakukan selama penyelidikan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dikumpulkan, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi kondisi pembanding/kontrol dalam percobaan ini?
- ✓ Jenis kondisi perlakuan apa yang perlu diatur dan bagaimana melakukannya?
- ✓ Berapa set perlakuan yang dibuat, agar dapat ditentukan berapa set perlengkapan yang dibutuhkan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dianalisis, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Bagaimana menentukan produk fermentasi yang optimal/baik?
- ✓ Pengukuran apa saja yang harus dilakukan?
- ✓ Bagaimana data akan ditabulasikan? Persiapkan sebelum kegiatan pengamatan.
- ✓ Apakah perlu dibuat tabel, diagram, atau grafik untuk membantu menganalisis data?

Hipotesis

- ✓ Sebelum merancang dan melaksanakan percobaan, diskusikan pertanyaan penyelidikan di atas dengan anggota kelompokmu.
- ✓ Catat hasil diskusi kelompokmu dalam bentuk argumen pada kolom di bawah ini:

Argumen

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

- ✓ Tuliskan juga hipotesis penyelidikan kelompokmu

Percobaan

Susunlah rancangan dan laksanakan percobaan untuk membuktikan hipotesis kelompok Anda.

Alat dan bahan yang digunakan**Metode/ cara kerja (dalam bentuk bagan/gambar)**

Perumusan Argumen

Buatlah inferensi dari data hasil percobaan dan penjelasan mengapa hasil penyelidikan demikian, yang digunakan untuk merumuskan argumen kelompok Anda berkaitan dengan pertanyaan penyelidikan yang diajukan.

Argumen:

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

Argumentasi Kelas

- ✓ Setiap perwakilan kelompok mempresentasikan argumen hasil kelompoknya dalam kelompok kecil yang dibentuk oleh perwakilan dari tiap kelompok, dan mencatat setiap saran, masukan, dari kelompok lain, baik itu setuju ataupun tidak dengan argumen kelompok Anda
- ✓ Kelompok lain mengkritisi argumen kelompok yang presentasi yang meliputi mengkritisi argumen, kesimpulan, penjelasan, metode yang digunakan dan dasar teori yang disampaikan. Sementara dalam argumennya, perlu dikritisi isi klaimnya, kualitas bukti yang disertakan untuk mendukung klaim dan kekuatan rasional dari penjelasan bukti yang disertakan.
- ✓ Perlu diingat, tujuan dari sesi argumentasi ini bukanlah untuk meyakinkan kelompok lain bahwa argumen kelompok Anda paling baik, melainkan untuk mengidentifikasi kesalahan atau kekeliruan dalam membuat rasional dan penjelasan argumennya, sehingga dapat diperbaiki.
- ✓ Catatlah setiap masukan dan kritik dari kelompok lain sebagai bahan pertimbangan dalam memperbaiki argumen untuk laporan tertulis.
- ✓ Setelah selesai sesi argumentasi, Anda dapat kembali kepada kelompok Anda dan mendiskusikan masukan dari kelompok lain untuk merivisi argumen yang disusun. Kelompok Anda mungkin perlu mengumpulkan lebih banyak data untuk memperbaikinya.

Laporan Tertulis

- ✓ Buatlah laporan tertulis hasil penyelidikan sebanyak 4 rangkap yang mencakup:
 - Pertanyaan apa yang coba dijawab dan mengapa?
 - Apa yang dilakukan selama penyelidikan dan mengapa penyelidikan dilakukan dengan cara seperti yang dilakukan?
 - Apa argumenmu?
- ✓ Laporan harus mampu menjawab pertanyaan ini dengan jelas, dengan disertai gambar, tabel, diagram atau grafik yang relevan.
- ✓ Pastikan laporan ditulis dengan gaya persuasif, Anda mencoba untuk meyakinkan yang lain bahwa klaimmu dapat diterima dan valid.
- ✓ Kumpulkan laporan 2 hari setelah pengamatan hasil percobaan dan sesi diskusi.

Peer-Review

- ✓ Anda akan menerima laporan mahasiswa lain dengan kode tanpa identitas, untuk Anda review dengan mengacu pada panduan penilaian peer review yang Anda peroleh.
- ✓ Hasil review diserahkan kembali kepada instruktur setelah selesai dan tidak diperkenankan dibawa pulang.

Revisi dan Evaluasi

- ✓ Anda akan menerima kembali laporan penyelidikan Anda yang telah direview oleh teman Anda untuk direvisi sesuai masukan dari reviewer.
- ✓ Kumpulkan hasil revisi kepada instruktur 2 hari setelah Anda terima untuk dievaluasi oleh instruktur.



PENDAHULUAN

Bagaimana kalian memperoleh air untuk keperluan minum? Apakah dari air sumur, ledeng, sungai, air minum kemasan bermerek atau air minum isi ulang? Apakah perlu dimasak?

Air merupakan kebutuhan yang vital bagi kehidupan, khususnya kebutuhan manusia. Semua makhluk hidup membutuhkan air untuk kehidupannya. Manusia membutuhkan air bersih untuk berbagai keperluan, mulai dari, minum, memasak, mandi, mencuci dan sebagainya. Air bersih untuk minum memiliki persyaratan paling tinggi. Pengolahan air minum paling sederhana dan paling banyak diterapkan adalah dengan mendidihkannya. Sementara ketersediaan air bersih sangat terbatas, karena sebagian besar dari mereka sudah tercemar, baik berupa cemaran fisik, kimia maupun biologis.

Kualitas air bersih untuk rumah tangga harus memenuhi persyaratan menurut peraturan kementerian kesehatan, yang di antaranya adalah bebas dari kehadiran mikroba patogen. Kehadiran mikroorganisme **indikator** di perairan yang digunakan dalam analisis air menunjukkan bukti bahwa air tersebut tercemar feses manusia atau hewan berdarah panas lainnya. Hal ini berarti kemungkinan besar air tersebut juga mengandung bakteri patogen yang berpeluang hadir dalam saluran pencernaan. Mikroorganisme indikator yang ideal untuk pengujian air adalah *Escherichia coli* dan kelompok bakteri *koliform* lainnya. Untuk menguji kehadiran bakteri *koliform* dalam sampel air, digunakan metode *Most Probable Number* (MPN).

Pertanyaan pengarah:

- ✓ Apa persyaratan air yang dapat dikonsumsi berdasarkan warna, aroma, rasa, kandungan mineral dan kandungan mikroorganismenya?
- ✓ Apa faktor yang menentukan kehadiran mikroorganisme yang berada di air? Perairan yang seperti apa yang kemungkinan mengandung lebih banyak mikroba terutama yang bersifat patogen?
- ✓ Selain jumlahnya, jenis mikroba yang berada di dalam air juga menentukan kelayakan air untuk dikonsumsi. Jenis mikroba yang seperti apa yang seharusnya sama sekali tidak ada dalam air yang dikonsumsi?
- ✓ Bagaimana cara mendeteksi kehadiran mikroba patogen dengan menggunakan mikroba indikator?

Tugasmu

Desain dan laksanakan sebuah eksperimen untuk menentukan kehadiran mikroba patogen dalam sampel air yang diberikan dengan menguji kehadiran mikroba indikator koliform fekal *E. coli* menggunakan metode uji Most Probable Number (MPN) atau JPT pada 3 sampel air yang diberikan.

Uraian Jawaban Pertanyaan Pengarah

Pertanyaan penyelidikan:

Air yang manakah yang layak dikonsumsi, berdasarkan keberadaan mikroba indikator patogen *Escherichia coli* di dalamnya? Mengapa?

Material

Material berikut mungkin dibutuhkan dalam penyelidikan ini:

- Sampel air yang akan diuji
- Media *Lactose Broth* (LB)
- Media *Eosin Metilen Blue Agar* (EMB Agar)
- Aquades
- Pewarna kristal violet
- Iodium
- Pewarna Safranin
- Alkohol 70 %
- Minyak Emersi
- Kapas
- Korek api
- Tabung reaksi
- Tabung Durham
- Mikroskop
- Gelas beaker
- Objek glass dan Cover glass
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Cawan petri
- Inkubator
- Petridish
- Rak tabung reaksi
- Bunsen
- Jarum Inokulasi/Ose

Untuk keamanan:

1. Cuci tangan dengan sabun sebelum dan sesudah bekerja secara aseptik pada percobaan.
2. Selalu gunakan sarung tangan karet dan masker selama bekerja dengan bakteri.
3. Ikuti semua peraturan keamanan laboratorium.

Memulai

Tahap pertama untuk melaksanakan percobaan ini adalah menentukan karakteristik sampel air yang akan diuji, agar dapat disusun dugaan atau hipotesis kemungkinan hadirnya mikroba patogen di dalamnya. Dengan mengikuti prosedur uji mikrobiologis air dengan metode MPN, tentukanlah sampel air mana yang layak untuk dijadikan sumber air minum secara langsung. Uji MPN ini terdiri atas 3 tahap, yaitu uji duga, uji konfirmasi dan uji lengkap.

Untuk menentukan data yang harus dikumpulkan, perhatikan pertanyaan-pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi variabel bebasnya?
- ✓ Jenis pengukuran apa saja yang perlu dilakukan selama penyelidikan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dikumpulkan, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Apa yang akan menjadi kondisi pembanding/kontrol dalam percobaan ini?
- ✓ Jenis kondisi perlakuan apa yang perlu diatur dan bagaimana melakukannya?
- ✓ Berapa set perlakuan yang dibuat, agar dapat ditentukan berapa set perlengkapan yang dibutuhkan?

Untuk menentukan bagaimana data akan dianalisis, perhatikan pertanyaan berikut:

- ✓ Bagaimana makna dari setiap data yang merupakan hasil setiap uji?
- ✓ Pengukuran apa saja yang harus dilakukan? Bagaimana tabulasi data yang diperoleh?
- ✓ Apakah perlu dibuat tabel, diagram, atau grafik untuk membantu menganalisis data?

Hipotesis

- ✓ Sebelum merancang dan melaksanakan percobaan, diskusikan pertanyaan penyelidikan di atas dengan anggota kelompokmu.
- ✓ Catat hasil diskusi kelompokmu dalam bentuk argumen pada kolom di bawah ini:


Argumen

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

- ✓ Tuliskan juga hipotesis penyelidikan kelompokmu

Percobaan

Susunlah rancangan dan laksanakan percobaan untuk membuktikan hipotesis kelompok Anda.

Alat dan bahan yang digunakan**Metode/ cara kerja (dalam bentuk bagan/gambar)**

Perumusan Argumen

Buatlah inferensi dari data hasil percobaan dan penjelasan mengapa hasil penyelidikan demikian, yang digunakan untuk merumuskan argumen kelompok Anda berkaitan dengan pertanyaan penyelidikan yang diajukan.

Argumen:

Pertanyaan penyelidikan	
Klaim	
Bukti	Rasional

Argumentasi Kelas

- ✓ Setiap perwakilan kelompok mempresentasikan argumen hasil kelompoknya dalam kelompok kecil yang dibentuk oleh perwakilan dari tiap kelompok, dan mencatat setiap saran, masukan, dari kelompok lain, baik itu setuju ataupun tidak dengan argumen kelompok Anda
- ✓ Kelompok lain mengkritisi argumen kelompok yang presentasi yang meliputi mengkritisi argumen, kesimpulan, penjelasan, metode yang digunakan dan dasar teori yang disampaikan. Sementara dalam argumennya, perlu dikritisi isi klaimnya, kualitas bukti yang disertakan untuk mendukung klaim dan kekuatan rasional dari penjelasan bukti yang disertakan.
- ✓ Perlu diingat, tujuan dari sesi argumentasi ini bukanlah untuk meyakinkan kelompok lain bahwa argumen kelompok Anda paling baik, melainkan untuk mengidentifikasi kesalahan atau kekeliruan dalam membuat rasional dan penjelasan argumennya, sehingga dapat diperbaiki.
- ✓ Catatlah setiap masukan dan kritik dari kelompok lain sebagai bahan pertimbangan dalam memperbaiki argumen untuk laporan tertulis.
- ✓ Setelah selesai sesi argumentasi, Anda dapat kembali kepada kelompok Anda dan mendiskusikan masukan dari kelompok lain untuk merivisi argumen yang disusun. Kelompok Anda mungkin perlu mengumpulkan lebih banyak data untuk memperbaikinya.

Laporan Tertulis

- ✓ Buatlah laporan tertulis hasil penyelidikan sebanyak 4 rangkap yang mencakup:
 - Pertanyaan apa yang coba dijawab dan mengapa?
 - Apa yang dilakukan selama penyelidikan dan mengapa penyelidikan dilakukan dengan cara seperti yang dilakukan?
 - Apa argumenmu?
- ✓ Laporan harus mampu menjawab pertanyaan ini dengan jelas, dengan disertai gambar, tabel, diagram atau grafik yang relevan.
- ✓ Pastikan laporan ditulis dengan gaya persuasif, Anda mencoba untuk meyakinkan yang lain bahwa klaimmu dapat diterima dan valid.
- ✓ Kumpulkan laporan 2 hari setelah pengamatan hasil percobaan dan sesi diskusi.

Peer-Review

- ✓ Anda akan menerima laporan mahasiswa lain dengan kode tanpa identitas, untuk Anda review dengan mengacu pada panduan penilaian peer review yang Anda peroleh.
- ✓ Hasil review diserahkan kembali kepada instruktur setelah selesai dan tidak diperkenankan dibawa pulang.

Revisi dan Evaluasi

- ✓ Anda akan menerima kembali laporan penyelidikan Anda yang telah direview oleh teman Anda untuk direvisi sesuai masukan dari reviewer.
- ✓ Kumpulkan hasil revisi kepada instruktur 2 hari setelah Anda terima untuk dievaluasi oleh instruktur.